

JAQUELINE CARDOSO RIBEIRO

Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum

São Carlos, Brasil

2022

JAQUELINE CARDOSO RIBEIRO

Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Versão corrigida

São Carlos, Brasil

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

C484a Cardoso Ribeiro, Jaqueline
Avaliação da produção de biohidrogênio e
ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de
soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste
de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em
indústria de processamento de atum / Jaqueline Cardoso
Ribeiro; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e
Área de Concentração em Ciências da Engenharia
Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2022.

1. Fermentação escura. 2. Hidrogênio. 3. Ácidos
graxos voláteis. 4. Sem tampões. 5. Conversão de
proteínas. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **JAQUELINE CARDOSO RIBEIRO**.

Título da tese: "Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum".

Data da defesa: 08/07/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Titular **Marcelo Zaiat** (Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro**

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Gustavo Henrique Ribeiro da Silva**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Bauru)

Aprovado

Profa. Dra. **Bruna de Souza Moraes**

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Profa. Dra. **Bruna Soares Fernandes**

(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Fernando por estar sempre ao meu lado me apoiando e me estimulando em minha trajetória em busca do conhecimento e aperfeiçoamento, e aos meus pais, Elaine e Silvio, por terem sido cruciais para que eu me tornasse quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial pelo dom da vida e por todas as oportunidades às quais eu tive acesso, que acabaram me trazendo até aqui e me ajudando a me desenvolver para ter a capacidade de concluir mais essa etapa da minha vida.

Ao meu marido Fernando por sempre estar ao meu lado. Por ser meu melhor amigo, a pessoa com quem sempre quero comemorar minhas vitórias e também a primeira pessoa que eu procuro para “chorar minhas pitangas”. Agradeço por você me aguentar, mesmo quando nem eu mesma estou me aguentando, rsrs.

Aos meus pais, Elaine e Silvio, por sempre terem sido um exemplo tão admirável para mim, por terem me dado uma base tão sólida e sempre serem o meu porto seguro.

À Scar, um membro de quatro patinhas da nossa família, que foi sempre minha companhia fiel durante horas e mais horas de escrita e que nesse exato momento está olhando para mim com sua carinha preta e olhos azuis.

Ao meu Orientador Zaiat, primeiramente por ter me acolhido de braços abertos mesmo eu sendo uma “forasteira” no grupo e por ter tido tanta paciência e compreensão comigo ao longo deste período. E principalmente, por além de ser um orientador tão competente que sempre me deu conselhos e direcionamento, compartilhando todo o seu conhecimento e experiência, ter sido também um amigo e parceiro nesta jornada. Também agradeço muito por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste grupo de pesquisa tão acolhedor, divertido e que está sempre buscando excelência e progresso no que se propõe a fazer.

Falando no grupo de pesquisa, gostaria de agradecer imensamente aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo, compartilhamento de experiências, conhecimento e ajuda sempre que precisei, e principalmente pelos momentos de descontração passados nesse ambiente de trabalho tão maravilhoso e acolhedor. Gostaria muito de citar nome por nome, porém não vou fazê-lo, pois foram tantas pessoas maravilhosas que conheci nesta trajetória, e que tocaram minha vida de uma forma especial, que precisaria de muitas páginas de agradecimentos, e também não quero correr o risco de esquecer ninguém “S2”. Vou dar apenas um destaque para as meninas do grupo “Rolezinhos Mara”, que além de serem as melhores companhias, acabaram virando uma rede de apoio e um ouvido amigo quando precisamos.

Aos professores e equipe de profissionais do LPB pela dedicação, por sempre estarem prontos a ajudar, principalmente pela troca de experiência, conhecimento e amizade. Gostaria de fazer um agradecimento especial às técnicas que são como anjos da guarda para nós

pesquisadores. Elas sempre resolvem os “BOs” que acabam aparecendo. Muito obrigada Carol, Janja, Elô e Bel. Sem vocês esse laboratório não funcionaria.

Ao professor Gustavo Dacanal por ter disponibilizado seu laboratório e contribuído para análises de distribuição de tamanho de partículas da biomassa, por sua colaboração nos artigos acadêmicos e trabalhos submetidos em eventos, e por ter sido tão prestativo e sempre pronto a ajudar em tudo que fosse necessário.

À professora Valéria Maia Merzel por ter disponibilizado seu laboratório para análises microbiológicas de todo o trabalho, por ter compartilhado seus conhecimentos que foram fundamentais para o desenvolvimento de um trabalho final com maior qualidade, e por ter contribuído imensamente nos artigos acadêmicos e trabalhos submetidos em eventos.

Ao pessoal do Biogroup de Santiago de Compostela: professor Lema, Marta, Miguel, Juan e Riccardo por terem me recebido tão bem em seu grupo, por terem proporcionado todas as condições necessárias para desenvolver uma BEPE tão enriquecedora, pelos conhecimentos compartilhados, e a paciência e prestatividade para me ensinar tantas coisas.

Aproveitando o gancho do assunto da BEPE, gostaria de fazer um agradecimento especial ao Rodrigo por ter me dado uma luz em um momento que eu estava tão perdida. Agradeço por você ter feito um trabalho tão bom em sua BEPE, que criou uma ponte entre o LPB e o Biogroup. Agradeço por ter me ajudado tanto com a minha BEPE, sempre me dando conselhos e compartilhando experiências. E também agradeço muito por sua amizade nesse período de doutorado, tenho certeza que será algo que levarei para a vida toda.

E “*last but not least*”, à Tainá, primeiramente por ter sido a precursora de toda a minha pesquisa. A sua decisão de não utilizar alcalinizantes em seus reatores foi a razão de todo este trabalho existir. Agradeço por ter participado de forma tão ativa neste trabalho, por além de ter contribuído imensamente em toda a discussão de todos os resultados, por ter feito toda a parte de microbiologia (análises das amostras e a discussão dos resultados). Agradeço muito por ter compartilhado suas experiências e conhecimento. A sua participação neste trabalho foi imprescindível, mas gostaria de agradecer principalmente por sua amizade, para mim foi uma experiência ótima trabalhar com você e te conhecer. Além de ser uma profissional extremamente competente, você se mostrou como uma amiga com quem eu sempre pude contar, conversar e ser totalmente sincera. Agradeço por toda a sua paciência comigo, por sempre me ensinar e explicar coisas que eu não sabia e sempre me socorrer quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – processo 1740666) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processos

2015/06246-7, 2017/06940-6 e 2019/25341-1) pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

RESUMO

RIBEIRO, J. C. **Avaliação da produção de biohidrogênio e ácidos orgânicos em reatores acidogênicos a partir de soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH e de água residuária rica em proteínas gerada em indústria de processamento de atum.** 2022. 172 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Neste trabalho, avaliou-se a produção de biohidrogênio (bioH_2), ácidos orgânicos (AO) e solventes, por fermentação escura a partir de três resíduos agroindustriais: o soro de queijo, a vinhaça de cana-de-açúcar e a água residuária do cozimento de atum em conserva. No primeiro estudo, foram utilizados reatores UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) e de leito fixo estruturado (LE) sem ajuste de pH para o processamento do soro, em condição mesofílica. Este primeiro estudo foi dividido em 3 etapas. A etapa 1 foi conduzida como um experimento controle com substrato constituído de sacarose e apresentou um rendimento médio de H_2 (HY) respectivo de $1,9 \pm 1,9$ e $1,1 \pm 0,7 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$ para o reator UASB e LE. A etapa 2 foi realizada com soro como substrato e não houve produção de bioH_2 , porém uma alta concentração máxima de ácido láctico foi obtida ($9,6 \text{ g L}^{-1}$). A etapa 3 foi operada com uma estratégia de adaptação da biomassa alimentando inicialmente os reatores com sacarose e substituindo-a gradativamente por soro, e trouxe melhores resultados de bioH_2 em comparação à etapa 2. Valores acima de 50% nas concentrações de H_2 no biogás foram obtidos para o UASB ao longo de toda a etapa, no entanto, a produção de bioH_2 a longo prazo não pôde ser alcançada. No próximo estudo, dois reatores UASB, em condição mesofílica (30°C) (U30) e termofílica (55°C) (U55) foram operados com vinhaça sem ajuste de pH e a mesma estratégia de adaptação da biomassa com sacarose e introdução gradativa do substrato foi utilizada. A produção de bioH_2 foi viável apenas com sacarose e pH abaixo de 3,0, com valores médios respectivos de $1,5 \pm 0,7$ e $1,5 \pm 1,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$ para o U30 e U55, os quais cessaram com a substituição da sacarose pela vinhaça. Quando o soro e a vinhaça eram os únicos substratos, as bactérias não produtoras de hidrogênio substituíram as hidrogenogênicas encontradas com sacarose, conforme o valor de pH nos reatores aumentou naturalmente. Resultados promissores de produção de AO e solventes foram obtidos com vinhaça, com um rendimento médio de 376 ± 52 e $248 \pm 122 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{ent}}$ para os reatores U30 e U55, respectivamente. No último estudo, um reator contínuo de mistura alimentado com água residuária de cozimento de atum em conserva foi avaliado. Foram obtidos resultados extremamente satisfatórios de conversão do substrato a AO com um grau máximo de acidificação de 73%. No entanto, não foi possível a obtenção de uma alta seletividade de produtos. A composição do substrato se mostrou tão importante quanto o pH, pois alguns aminoácidos (AA) podem ter diferentes produtos de degradação dependendo das condições operacionais ou das interações com outros AA, dificultando a obtenção de alta seletividade no processo. Os três substratos avaliados neste estudo mostraram um grande potencial para a produção de AO por fermentação escura e vale destacar que resultados extremamente promissores foram obtidos mesmo nas etapas sem ajuste de pH.

Palavras-chave: Fermentação escura. Hidrogênio. Ácidos graxos voláteis. Sem tampões. Conversão de proteínas.

ABSTRACT

RIBEIRO, J. C. **Evaluation of the production of biohydrogen and organic acids in acidogenic reactors from cheese whey and sugarcane vinasse without pH adjustment and from protein-rich wastewater generated in the tuna processing industry.** 2022. 172 p. Thesis (Doctoral) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

In this work, the production of biohydrogen (bioH₂), organic acids (OA) and solvents was evaluated through dark fermentation of three agroindustrial wastes: cheese whey, sugarcane vinasse and wastewater from canned tuna cooking. In the first study, an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor and a structured fixed bed (FB) reactor without pH adjustment were used for whey processing, in mesophilic condition. This first study was divided into 3 stages. Stage 1 was conducted as a control experiment with sucrose substrate and showed an average H₂ yield (HY) of respectively 1.9 ± 1.9 and 1.1 ± 0.7 mol H₂ mol⁻¹ sucrose_{consumed} for UASB and FB reactor. Stage 2 was performed with whey as substrate and there was no production of bioH₂, however a high maximum lactic acid concentration was obtained (9.6 g L⁻¹). Stage 3 was operated with a biomass adaptation strategy, initially feeding the reactors with sucrose and gradually replacing it with whey and it brought better bioH₂ results compared to stage 2. Values above 50% of H₂ concentrations in biogas were obtained for UASB reactor throughout the entire stage, however, long-term bioH₂ production could not be achieved. In the next study, two UASB reactors, in mesophilic (30°C) (U30) and thermophilic (55°C) (U55) conditions were operated with vinasse without pH adjustment and the same strategy of biomass adaptation with sucrose and gradual introduction of the substrate was used. BioH₂ production was viable only with sucrose and pH below 3.0, with respective average values of 1.5 ± 0.7 and 1.5 ± 1.1 mol H₂ mol⁻¹ sucrose_{consumed} for U30 and U55, which ceased with the replacement of sucrose by vinasse. When whey and vinasse were the only substrates, non-hydrogen-producing bacteria replaced the hydrogenogenic ones found with sucrose, as the pH value in the reactors naturally increased. Promising results for the production of OA and solvents were obtained with vinasse, with an average yield of 376 ± 52 and 248 ± 122 mg COD_{OA} g⁻¹ COD_{in} for U30 and U55 reactors, respectively. In the last study, a continuous mixing reactor fed with wastewater from cooking of canned tuna was evaluated. Extremely satisfactory results of substrate conversion to OA were obtained with a maximum acidification degree of 73%. However, it was not possible to obtain a high selectivity of products. Substrate composition proved to be as important as pH, as some amino acids (AA) may have different degradation products depending on operational conditions or interactions with other AA, making it difficult to obtain high selectivity in the process. The three substrates evaluated in this study showed great potential for OA production through dark fermentation and it is worth noting that extremely promising results were obtained even in the stages with no pH adjustment.

Keywords: Dark fermentation. Hydrogen. Volatile fatty acids. No buffers. Proteins conversion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da tese.	27
Figura 2 – Esquema simplificado do tratamento anaeróbico de duplo estágio.	30
Figura 3 - Sequências metabólicas envolvidas na bioconversão anaeróbia da matéria orgânica.	32
Figura 4 – Reator de leito estruturado (LE) (a) e reator UASB - <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> (reator anaeróbico de fluxo ascendente) (b) utilizado no processamento do soro de queijo.	71
Figura 5 - Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em cada condição na (a) Etapa 1 – U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So (S) e (e) LE-So (S) para processamento de soro de queijo.	82
Figura 6 – Concentrações médias de metabólitos solúveis correspondentes a cada condição da (a) Etapa 1 - U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So (S) e (e) LE-So (S) para processamento de soro de queijo.	88
Figura 7 – Rendimentos médios de metabólitos solúveis (YM) correspondentes a cada condição da (a) Etapa 1 - U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So(S) e (e) LE-So(S) para processamento de soro de queijo.	89
Figura 8 - Curva de rarefação baseada em contagens de sequência para processamento de soro de queijo.	98
Figura 9 – Gráfico 2D de microbiomas Bray-Curtis PCoA para processamento de soro de queijo.	99
Figura 10 - Gêneros prevalentes nos reatores U-S e LE-S (Etapa 1), U-So e LE-So (Etapa 2) e U-So (S) e LE-So (S) (Etapa 3) ao final da operação para processamento de soro de queijo.	100
Figura 11 - Árvore filogenética baseada em genes parciais de rRNA 16S representando os gêneros mais prevalentes nos reatores acidogênicos ao final de cada etapa de operação com soro de queijo e seus parentes mais próximos disponíveis no banco de dados público SILVA.	101
Figura 12 - Diagrama esquemático do reator UASB utilizado para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	106
Figura 13 - Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e composição do biogás (CB) em cada condição do (a) U30 e (b) U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	114

Figura 14 – Concentração de metabólitos afluyente ao (a) U30, (b) U55 e efluente ao (c) U30 e (d) U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	120
Figura 15 - Distribuição do tamanho de partícula da biomassa dos reatores U30 e U55 ao final da operação com vinhaça de cana-de-açúcar e seus respectivos inóculos em sua forma original.....	123
Figura 16 - Curva de rarefação baseada em contagens de sequência para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	124
Figura 17 - Abundância relativa de gêneros prevalentes no U30 alimentado com efluente à base de 100% de sacarose (U30-S100), 50% de sacarose e 50% de vinhaça diluída (U30-S50V50) e 100% de vinhaça diluída (U30-V100), e no U55 alimentado com efluente à base de 100% vinhaça diluída (U55-V100).	126
Figura 18 - Composição de aminoácidos da água residuária de cozimento de atum em conserva.	133
Figura 19 - Diagrama esquemático do reator de mistura utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.	134
Figura 20 – Resultados do teste de potencial bioquímico de metano (PBM) para a água residuária de cozimento de atum em conserva.	138
Figura 21 – Valores de DQO no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.	139
Figura 22 – Grau de amonificação e acidificação no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.	142
Figura 23 – Concentração de AO no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.	144
Figura 24 – Comparação do espectro de AO entre todas as etapas do reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Energia livre padrão de Gibbs de reações envolvidas nos principais processos anaeróbios.....	31
Tabela 2 – Principais etapas do estudo.....	67
Tabela 3 - Resumo das etapas e suas condições operacionais para processamento de soro de queijo.	72
Tabela 4 – Composição da solução de nutrientes.....	72
Tabela 5 – Valores médios de pH, conversão de sacarose (EC_S), carboidratos (EC_{CH}) e proteínas (EC_{Pr}), rendimento de H_2 (HY) e composição do biogás (CB) para processamento de soro de queijo.	80
Tabela 6 - Condições operacionais e desempenho na produção de hidrogênio de reatores anaeróbios aplicados no tratamento de soro.....	81
Tabela 7 – Rendimento médio de metabólitos (YM) para cada condição em cada etapa e valores médios de rendimento de ácido láctico (YHLA) na Etapa 2 (So) para processamento de soro de queijo.....	93
Tabela 8 - Índices de diversidade alfa das comunidades microbianas do inóculo e reatores para processamento de soro de queijo.	95
Tabela 9 – ASV com abundâncias $\geq 10\%$ nos reatores e inóculo para processamento de soro de queijo.	102
Tabela 10 - Caracterização composicional da vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do período de operação dos reatores.....	107
Tabela 11 - Valores médios de pH, conversão de carboidratos (EC_{CH}), glicerol (EC_{Gli}), fração dos principais compostos no balanço de massa global (BMG $DQO_{ef}/H_2/SSV$), fração dos principais compostos solúveis no efluente de DQO solúvel ($DQO_{ef} CH/Pr/MS$), rendimento de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em cada condição do U30 e U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	113
Tabela 12 – Valores médios de grau de acidificação (%), rendimento (Y_{AO}) e produção (P_{OA}) de ácidos orgânicos e solventes em cada condição do U30 e U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.....	118
Tabela 13 - ASV com abundância maior de 10% em no mínimo uma das amostras do processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.	125
Tabela 14 – Caracterização do efluente de cozimento de atum em conserva.	132

Tabela 15 – Etapas do estudo conduzido com água residuária de cozimento de atum em conserva e suas respectivas condições operacionais.	135
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aminoácidos
AGV	ácidos graxos voláteis
AO	ácidos orgânicos
ARCAC	água residuária de cozimento de atum em conserva
BEPE	Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior
CH	carboidratos totais
CNTP	condições normais de temperatura e pressão
COT	carbono orgânico total
COV	carga orgânica volumétrica
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DA	digestão anaeróbia
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DNA	ácido desoxirribonucléico
DQO	demanda química de oxigênio
DRM	divisão de recursos microbianos
DSFF	<i>downflow stationary fixed film</i>
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	<i>expanded granular sludge bed</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Gli	glicerol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISR	<i>inoculum to substrate ratio</i>
LE	leito fixo estruturado
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
PBM	potencial bioquímico de metano
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PHA	polihidroxialcanoatos
PVH	produção volumétrica de hidrogênio
So	soro de queijo
SFT	sólidos fixos totais
SSF	sólidos em suspensão fixos

SST	sólidos em suspensão totais
SSV	sólidos em suspensão voláteis
ST	sólidos totais
SVT	sólidos voláteis totais
TDH	tempo de detenção hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USC	Universidade de Santiago de Compostela
USP	Universidade de São Paulo
UTO	unidades taxonômicas operacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	molibdato de amônio
$[\text{HAc}]_{\text{homo}}$	produção de ácido acético pela rota homoacetogênica
ΔG°	energia livre de Gibbs
$^\circ\text{C}$	grau Celsius
μm	micrômetro
μs	microsiemens
2D	duas dimensões
BioH_2	biohidrogênio
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	sacarose
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	glicose
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	hidróxido de cálcio (cal hidratada)
CaCl_2	cloreto de cálcio
CB	composição do biogás
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	butirato
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$	propionato
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	etanol
CH_3COO^-	acetato
CH_4	gás metano
cm	centímetro
CO_2	dióxido de carbono
CoCl_2	cloreto de cobalto
CuCl_2	cloreto de cobre
D	coeficiente de dispersão
d	dias
EC_{CH}	conversão de carboidratos totais
EC_{Pr}	conversão de proteína
EC_{S}	conversão de sacarose
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH	etanol
FeCl_3	cloreto férrico
g	grama

h	horas
H ⁺	próton
H ₂	gás hidrogênio
H ₂ O	água
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	ácido bórico
ha	hectare
HAc	ácido acético
HBu	ácido butírico
HCa	ácido capróico
Hcc	constante de Henry
HCl	ácido clorídrico
HCOO ⁻	formiato
HLa	ácido láctico
HPr	ácido propiônico
HVa	ácido valérico
HY	rendimento de hidrogênio
HY _{max}	rendimento máximo de hidrogênio
iHBu	ácido isobutírico
K ₂ O	óxido de potássio
kcal	quilocalorias
kg	quilograma
KH ₂ PO	fosfato monopotássico
kJ	quilojoule
L	litro
m	metro
MeOH	metanol
mg	miligrama
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mm	milímetro
mmol	milimol
MnCl ₂	cloreto de manganês

N	número de mol
N ₂	gás nitrogênio
Na ⁺	íon de sódio
Na ₂ SeO ₃	selenito de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NiCl ₂	cloreto de níquel
Pa	Pascal
P _{AO}	produtividade de ácidos orgânicos e solventes
pH	potencial hidrogeniônico
PH ₂	pressão parcial de hidrogênio
pKa	valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido
PVH	produção volumétrica de hidrogênio
PVH _{max}	produção volumétrica máxima de hidrogênio
R	constante universal dos gases perfeitos
S ₀	concentração do substrato
VBG	vazão de biogás
Y _{AO}	rendimento de ácidos orgânicos e solventes
YHL _a	rendimento de ácido láctico
YM	rendimento de metabólitos
Y _x	coeficiente de rendimento de célula
ZnCl ₂	cloreto de zinco
μL	microlitro

SUMÁRIO

Parte I - CONTEXTUALIZAÇÃO	19
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Hipóteses e objetivos gerais propostos	25
1.2 Esquematização da tese	26
Parte II - REVISÃO DA LITERATURA	28
2 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE DUPLO ESTÁGIO	29
3 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR FERMENTAÇÃO ESCURA	35
4 PROCESSAMENTO DE SORO DE QUEIJO EM REATORES ACIDOGÊNICOS	44
5 PROCESSAMENTO DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATORES ACIDOGÊNICOS	51
6 PROCESSAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE ATUM EM CONSERVA EM REATORES ACIDOGÊNICOS.	59
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	65
Parte III - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	66
8 ETAPAS DO ESTUDO	67
Parte IV - ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO ACIDOGÊNICA	69
9 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DO SORO DE QUEIJO	70
9.1 Material e métodos	70
9.1.1 Abordagem experimental e condições operacionais.....	70
9.1.2 Monitoramento dos reatores e métodos analíticos.....	73
9.1.3 Avaliação de desempenho dos reatores	74
9.1.4 Análise da comunidade microbiana.....	76
9.2 Resultados e discussões	77

9.2.1	Produção de bioH ₂ e conversão de substrato	77
9.2.2	Produção de ácidos orgânicos e solventes	87
9.2.3	Composição da comunidade microbiana	95
9.3	Aplicações práticas e perspectivas de pesquisas futuras	103
9.4	Conclusões	104
10	PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	105
10.1	Material e métodos	105
10.1.1	Abordagem experimental e condições operacionais.....	105
10.1.2	Monitoramento do reator, métodos analíticos e avaliação de desempenho	108
10.1.3	Análise da comunidade microbiana.....	109
10.2	Resultados e discussões	110
10.2.1	Produção de bioH ₂ e conversão de substrato.....	110
10.2.2	Produção de ácidos orgânicos e solventes	116
10.2.3	Estrutura e composição da comunidade microbiana	122
10.3	Comparação do processamento do soro de queijo com o processamento da vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH: conclusões gerais	128
10.4	Conclusões	129
11	PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DE ÁGUA RESIDUÁRIA RICA EM PROTEÍNA: EFLUENTE DO COZIMENTO DE ATUM EM CONSERVA	131
11.2	Material e métodos	131
11.2.1	Caracterização do substrato	131
11.2.2	Configuração do experimento, condições operacionais e procedimento de inoculação.....	134
11.2.3	Métodos analíticos	136
11.2.4	Cálculos	137

11.3 Resultados e discussões	137
11.3.1 Teste de potencial bioquímico de metano (PBM)	138
11.3.2 Operação do reator.....	138
11.3.3 Influência do TDH e pH no grau de acidificação e amonificação.....	140
11.3.4 Influência do TDH e pH no espectro de produtos	143
11.4 Conclusões.....	147
Parte V - CONCLUSÕES GERAIS E PROPOSTAS DE ESTUDOS FUTUROS	148
12 CONCLUSÕES GERAIS.....	149
13 PROPOSTAS DE ESTUDOS FUTUROS	151
REFERÊNCIAS.....	152

Parte I - CONTEXTUALIZAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A atual demanda global por energia e produtos químicos é atendida principalmente por rota de síntese que é realizada por meio de processos químicos a partir de recursos de fontes fósseis não renováveis. Seus processos produzem vários gases prejudiciais, incluindo monóxido de carbono, dióxido de carbono (CO₂) e dióxido de enxofre durante o processo de combustão. A exaustão de tais recursos finitos é um problema ambiental de dimensão global e o aumento mundial da demanda energética e química, bem como a diminuição dos combustíveis fósseis, têm pressionado a busca por fontes renováveis alternativas.

A digestão anaeróbia (DA) é uma tecnologia consolidada de tratamento de resíduos orgânicos que apresenta diversas vantagens além de ser uma alternativa muito promissora para a obtenção de produtos que geralmente são derivados a partir de combustíveis fósseis. O metano é considerado o principal produto de interesse da DA, contudo, estudos recentes também têm buscado a recuperação de produtos intermediários gerados durante a etapa acidogênica. A produção de ácidos orgânicos (AO), solventes e hidrogênio a partir da DA de resíduos tem ganhado grande atenção devido ao alto valor agregado de tais produtos ou pelo possível uso em muitas indústrias (alimentícia, farmacêutica e cosmética). Tais produtos também apresentam aplicação como precursores de biocombustíveis, bioplásticos, ou no processo de alongamento de cadeia para a obtenção de outros ácidos de cadeia média ou longa.

A recuperação de produtos de interesse a partir do tratamento de resíduos se baseia no conceito de economia circular que visa promover uma base energética mais limpa e competitiva. Tal conceito tem sido grandemente difundido na comunidade científica nos últimos anos e tem acelerado o foco de pesquisas de alternativas ao uso da matriz fóssil. Vários estudos têm demonstrado diversos substratos e técnicas possíveis para produção de biohidrogênio (bioH₂) e metabólitos de interesse – AO e solventes, porém os processos atuais apresentam alto custo, baixos rendimentos e seletividade de produtos, o que dificulta sua aplicação em escala real.

A utilização de culturas mistas e substratos derivados de resíduos orgânicos reais é extremamente desejada para que a otimização de custos do processo de produção de bioH₂ e metabólitos de interesse seja alcançada. No entanto, esse é um objetivo bastante desafiador, pois além da necessidade de uma alta produtividade e rendimento de produtos, também existe a necessidade de que seja feito, de forma simultânea, o tratamento dos resíduos de forma eficiente antes de seu lançamento de modo a evitar pressões sobre o meio ambiente. Outro

grande desafio está na complexidade da composição dos substratos e das culturas mistas, o que dificulta o controle do processo e obtenção de produtos desejados.

A necessidade da otimização de estratégias operacionais também é uma grande barreira que impede que estudos conduzidos em escala de bancada sejam aplicados em escala real. Estratégias como a utilização de substratos simples como açúcares, culturas puras, pré-tratamento químico/térmico do inóculo ou o uso de produtos para o controle do pH podem tornar a ampliação de uma tecnologia inviável.

Com base nisto, o presente estudo focou na utilização de estratégias operacionais que reduzissem ao mínimo a utilização de produtos químicos ou energia, tornando o processo mais sustentável, principalmente economicamente, e possível de ser aplicado em escala real. Foi avaliada a recuperação de bioH₂, AO e solventes por meio da fermentação escura do soro de queijo, vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária do cozimento de atum em conserva. Nenhum tipo de pré-tratamento de lodo foi utilizado na inoculação dos reatores acidogênicos e nenhum tipo de ajuste de pH foi feito nas etapas conduzidas com soro e vinhaça, desta forma, minimizando ao máximo os requisitos operacionais para a acidificação destes efluentes. A água residuária da indústria de atum em conserva foi escolhida devido à sua composição rica em proteínas. Uma vez que a proteína constitui uma fração extremamente importante e presente na maioria dos resíduos, esta etapa foi conduzida a fim de proporcionar um melhor entendimento da produção de AO a partir deste composto. A escolha dos três efluentes também levou em consideração a sua importância regional em um contexto socioeconômico e seu impacto ambiental.

1.1 Hipóteses e objetivos gerais propostos

O presente trabalho está pautado em uma hipótese central, na qual se afirma que “**é possível obter produção contínua e significativa de bioH₂ e ácidos orgânicos por meio da fermentação escura de águas residuárias reais por cultura mista anaeróbia**”. Diante disto, o objetivo geral foi “**avaliar o potencial de produção de bioH₂ e ácidos orgânicos da fermentação escura do soro de queijo e vinhaça de cana-de açúcar e avaliar o potencial de produção e seletividade de ácidos orgânicos de uma água residuária rica em proteínas: efluente gerado no cozimento de atum em conserva**”.

Com base na contextualização dada sucintamente na introdução, e também, além do referencial teórico apresentado na próxima seção, foram estabelecidas quatro sub-hipóteses de trabalho, relacionando-se, a cada uma, um objetivo específico da pesquisa:

Sub-hipótese 1: Por meio de estratégias operacionais adequadas, é possível obter produção contínua e estável de bioH₂, ácidos orgânicos e solventes com substratos complexos constituídos de águas residuárias reais sem ajuste de pH.

Objetivo: Buscar a melhor condição operacional para reatores acidogênicos alimentados em uma primeira etapa por soro de queijo e em uma segunda etapa por vinhaça de cana-de-açúcar, sem alcalinização ou qualquer tipo de ajuste de pH, avaliando o potencial de valorização destes efluentes por meio da produção de bioH₂, ácidos orgânicos e solventes.

Sub-hipótese 2: O reator UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) apresenta uma configuração mais vantajosa para a produção de hidrogênio sem ajuste de pH devido à sua capacidade de autorregulação do sistema. Tal hipótese tem como base o estudo de Mota (2019), no qual obteve-se produção e rendimento de H₂ maiores e mais estáveis em um reator UASB comparando-se a um reator de leito fixo estruturado (LE).

Objetivo: Comparar o desempenho operacional e potencial de geração de bioH₂, ácidos orgânicos e solventes de um reator UASB com um reator LE na fermentação escura do soro de queijo;

Sub-hipótese 3: É possível selecionar bactérias produtoras de hidrogênio adaptadas a condições extremamente ácidas por meio de uma abordagem ecobiotecnológica, (baseada no

princípio da competição e seleção natural), ou seja, fornecendo um estresse seletivo para um metabolismo desejado em um sistema de comunidade microbiana diverso com base nas condições de operação e do substrato usado em um biorreator.

Objetivo: Avaliar a estratégia de alimentação dos reatores acidogênicos durante a partida com água residuária à base de sacarose para que seja promovida uma adaptação dos microrganismos selecionados em condições extremamente ácidas e estes possam se adaptar gradativamente a uma água residuária real.

Sub-hipótese 4: É possível obter maior produção e seletividade de ácidos orgânicos obtidos a partir da fermentação de substratos ricos em proteínas por meio de estratégias operacionais adequadas, no entanto ainda existe uma lacuna no conhecimento de como as proteínas se degradam, principalmente em relação à aplicação prática que demanda a utilização de substratos reais e culturas mistas de microrganismos.

Objetivo: Avaliar o efeito do TDH e pH na fermentação escura de uma água residuária real rica em proteínas: água de cozimento de atum em conserva utilizando cultura mista anaeróbia, buscando-se a maior produção de ácidos orgânicos e controle do espectro de produtos e desta forma, contribuir com uma área deficiente de conhecimento na literatura, a produção de ácidos orgânicos a partir de substratos reais ricos em proteínas.

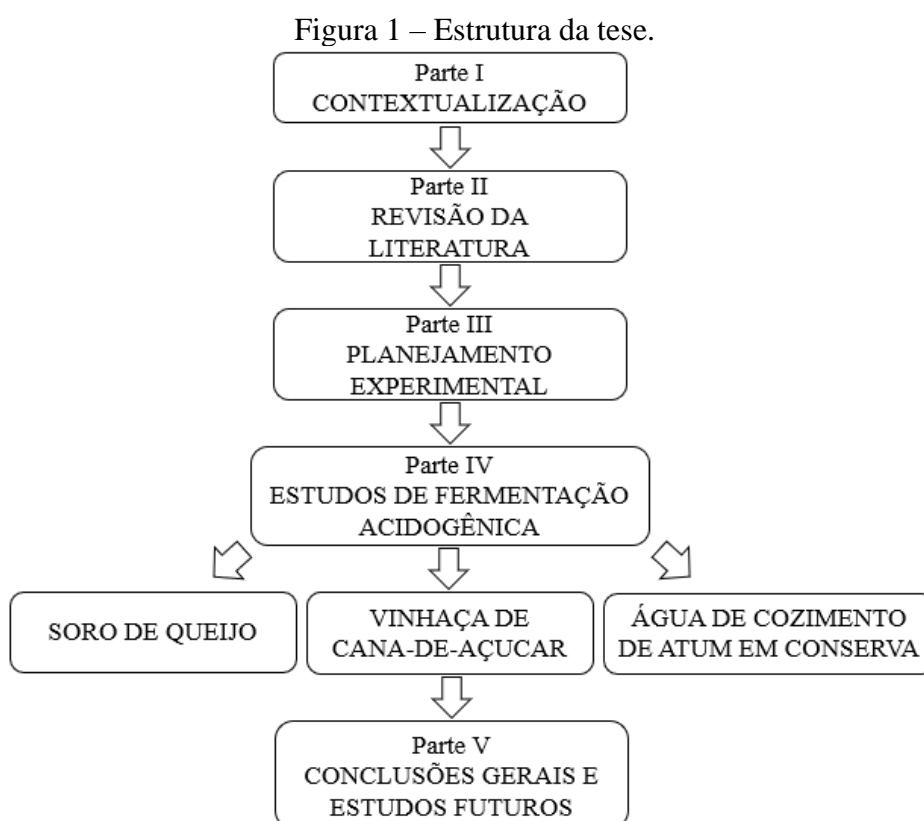
1.2 Esquematização da tese

Para uma melhor compreensão, o presente trabalho foi dividido em cinco partes gerais, conforme apresentado na Figura 1.

Na primeira parte, na qual esta seção está inserida, é apresentada a contextualização dessa pesquisa de maneira geral, bem como as hipóteses e objetivos gerais e a estrutura da tese. Na segunda parte, apresenta-se uma revisão da literatura com informações essenciais para a contextualização do tema abordado na Tese, o entendimento dos resultados e discussões apresentados neste estudo, além do contexto socioeconômico e ambiental no qual os temas abordados nesta pesquisa estão inseridos. Na terceira parte apresenta-se uma visão geral sobre o planejamento experimental utilizado nesta pesquisa e as principais etapas que orientaram a condução deste estudo. A parte quatro, em que se apresentam estudos de fermentação acidogênica foi dividida em três capítulos principais de acordo com os três substratos avaliados

nesta pesquisa, sendo o Capítulo 9 dedicado ao soro de queijo, o Capítulo 10 à vinhaça de cana-de-açúcar e o Capítulo 11 ao efluente de cozimento de atum em conserva. Por fim, na quinta e última parte, são apresentadas as conclusões gerais e propostas de estudos futuros.

O trabalho como um todo está composto por três estudos de fermentação acidogênica distintos, e uma vez que cada estudo possui suas especificidades, estes foram separados em capítulos com suas respectivas informações pertinentes, que englobam objetivos específicos; material e métodos; resultados e discussões e conclusões específicas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Parte II - REVISÃO DA LITERATURA

2 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE DUPLO ESTÁGIO

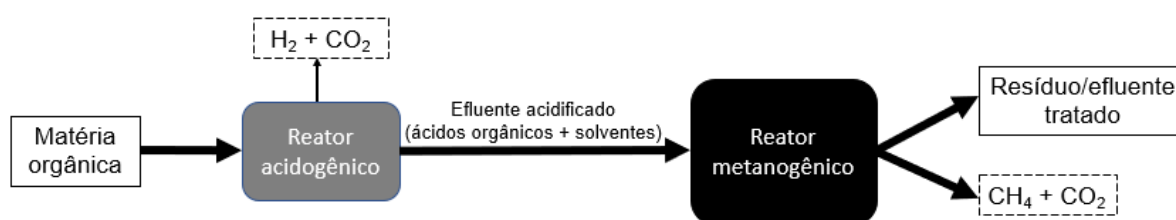
Considerando o aumento da demanda mundial por recursos naturais, principalmente energia, contra uma diminuição nas reservas de combustível fóssil, o maior atrativo da utilização da digestão anaeróbia (DA) não reside unicamente como um processo para reduzir a carga poluente de resíduos e mitigar os impactos ambientais. Estudos recentes destacam seu papel como um processo central de recuperação de recursos e que possibilita o uso de resíduos como matérias-primas para a produção de compostos de valor agregado, além da geração de bioenergia (BANU et al., 2021; BANU et al., 2020; CASTILLA-ARCHILLA; PAPIRIO; LENS, 2021; COLOMBO et al., 2019; ENG SÁNCHEZ et al., 2021; FUESS et al., 2017a; HWANG et al., 2004; KOUTROULI et al., 2009; MOTA et al., 2018).

O processo anaeróbio apresenta vantagens consolidadas em comparação com processos aeróbios. Não há limitação nas taxas de tratamento pela transferência de oxigênio e a ausência de necessidade de oxigênio também reduz os requisitos de energia para tratamento. Na DA apenas uma pequena parte dos resíduos é convertida em novas células, sendo a maior parte dos resíduos degradáveis (80 a 90% da porção orgânica degradável) convertidos em gás metano (potencial de uso como combustível), minimizando o problema de geração de excesso de lodo. Outras vantagens que podem ser citadas são a simplificação da operação, redução na demanda de espaço para instalação do sistema e biodegradação de componentes que não podem ser degradados aerobiamente (CHERNICHARO, 2007; FORESTI, 1994; MCCARTY e SMITH, 1986; SPEECE, 1996).

O tratamento anaeróbio também pode apresentar sensibilidade a mudanças de temperatura e pH devido a uma dependência de mecanismos auto-reguladores intrínsecos. Tais mecanismos ocorrem por interações entre diversos microrganismos que possuem funções distintas e específicas, mantendo assim, o equilíbrio do sistema. Outra desvantagem que pode ser citada é a menor eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes ao comparar-se com o tratamento aeróbio. Alguns problemas também podem ser gerados devido à disposição inadequada de resíduos na rede de coleta de esgoto, como produção de espuma e escuma, emissão de odores desagradáveis, corrosão e partida do sistema mais lenta caso não seja utilizado um lodo adaptado também são descritos (CHERNICHARO, 2007; FORESTI, 1994; LEITÃO et al., 2006; LETTINGA et al., 1980; MCCARTY e SMITH, 1986). No entanto, as desvantagens podem ser contornadas com estratégias de operação e um controle adequados do sistema e a conjugação de outros sistemas de pré e/ou pós-tratamento.

Esforços consideráveis têm sido feitos nas pesquisas para otimização do tratamento anaeróbio e uma solução que tem se apresentado bastante promissora é a sua separação em dois estágios. Tal configuração foi proposta inicialmente por Pohland e Ghosh (1971) com a separação física das principais etapas da DA: a acidogênese e a metanogênese em dois reatores distintos (Figura 2), para que condições ambientais ótimas inerentes a cada grupo de microrganismos envolvidos em cada etapa pudessem ser fornecidas, melhorando a estabilidade e facilitando o controle geral do processo (HALLENBECK; GHOSH, 2009). Nos sistemas de estágio único convencionais, os microrganismos da fase acidogênica e da fase metanogênica são mantidos juntos em um reator único. Tais microrganismos apresentam diferenças em termos de cinética de crescimento, nutrientes requeridos, fisiologia e sensibilidade às condições termodinâmicas e ambientais, resultando em uma relação de equilíbrio complexa no sistema, que pode ser desestabilizada (AQUINO e CHERNICHARO, 2005; FORESTI, 1994).

Figura 2 – Esquema simplificado do tratamento anaeróbio de duplo estágio.



Fonte: Elaborada pela autora.

O processo anaeróbio pode ser dividido, de forma muito simplificada, em quatro etapas, segundo as transformações bioquímicas que ocorrem: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Tabela 1); na presença de sulfato no afluente, ocorre também a sulfetogênese (Figura 3). Durante a hidrólise ocorre a conversão de polímeros orgânicos complexos (tais como carboidratos, lipídeos e proteínas) a monômeros (tais como açúcares, ácidos orgânicos (AO) e aminoácidos (AA)) por bactérias hidrolíticas. Na acidogênese, monômeros orgânicos são convertidos a hidrogênio (H_2), CO_2 , ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido butírico (HBu) e outros produtos orgânicos, tais como etanol (EtOH) e ácido láctico (HLa) por bactérias fermentativas. Na acetogênese, AO e álcoois são convertidos em HAc, H_2 e CO_2 por bactérias acetogênicas. E finalmente, na metanogênese, compostos oriundos da conversão realizada na acetogênese são os substratos utilizados pelas arqueias metanogênicas na produção de metano. As arqueias metanogênicas se dividem em dois tipos de acordo com o substrato utilizado para a produção de metano: hidrogenotróficas que utilizam H_2 e CO_2 e acetoclásticas que utilizam o

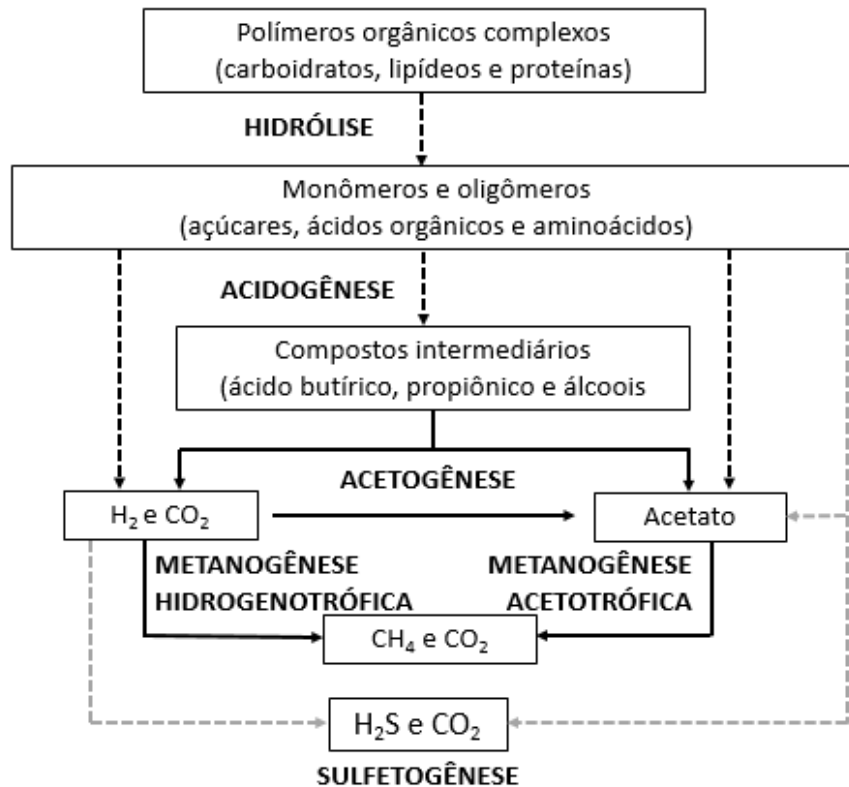
acetato. Em geral, cerca de 70% do conteúdo de CH₄ presente no biogás é produto das reações de transformação realizadas pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas (AQUINO e CHERNICHARO, 2005; FORESTI, 1994; LETTINGA; POL e ZEEMAN, 1996; MCCARTY e SMITH, 1986; MCCARTY, 1964; RITTMANN e MCCARTY, 2001; SPEECE, 1983).

Tabela 1 - Energia livre padrão de Gibbs de reações envolvidas nos principais processos anaeróbios.

Reação	ΔG° (kJ/reação)	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$ glicose propionato	-358	Acidogênese
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$ glicose butirato	-255	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$ glicose acetato	-206	
$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$ lactato acetato	- 4,2	Acetogênese
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ etanol acetato	+ 9,6	
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ butirato acetato	+ 48,1	
$CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3HCOO^-$ propionato acetato	+ 72,2	
$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ propionato acetato	+ 76,1	
$H_2 + \frac{1}{4} HCO_3^- + \frac{1}{4} H^+ \rightarrow \frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} H_2O$ hidrogênio metano	-33,9	Metanogênese
$HCOO^- + \frac{1}{4} H_2O + \frac{1}{4} H^+ \rightarrow \frac{1}{4} CH_4 + \frac{3}{4} HCO_3^-$ formiato metano	-32,6	
$CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$ acetato metano	-31	

Fonte: Elaborada pela autora com base em Aquino e Chernicharo (2005), Foresti (1994) e Stams et al. (2012).

Figura 3 - Sequências metabólicas envolvidas na bioconversão anaeróbia da matéria orgânica.



Fonte: Elaborada pela autora com base em Aquino e Chernicharo (2005) e Mccarty e Smith (1986), Lettinga; Pol e Zeeman (1996).

A separação do processo em duas fases pode oferecer vantagens, pois potencializa a recuperação de hidrogênio e AO na primeira fase (acidogênese) e metano na segunda fase (metanogênese), tornando o processo mais estável e aumentando as eficiências de remoção de matéria orgânica. Diversos estudos mostram que a produção e o rendimento de hidrogênio (HY) e metano (HM) em cada um dos dois estágios, contribuem para um aumento do rendimento energético final do sistema (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016; FUESS et al., 2017a; KOUTROULI et al., 2009; LUO et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012; SADDOUD; HASSAÏRI; SAYADI, 2007; VENETSANEAS et al., 2009). A DA é favorecida pela segregação dos estágios devido a possibilidade de melhora da hidrólise aumentando a disponibilidade de acetato para a etapa metanogênica, além de permitir a seleção e o enriquecimento de diferentes microrganismos em cada reator. A acidificação é limitada no primeiro reator evitando, assim, a sobrecarga e a inibição dos microrganismos metanogênicos no segundo reator (KE et al., 2005; KOUTROULI et al., 2009).

Ferraz Júnior et al. (2016) avaliaram o desempenho de reatores UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) termofílicos

operados continuamente com vinhaça de cana-de-açúcar nos sistemas de estágio único (UASB I) e de dois estágios (UASB II) durante a safra de colheita da cana-de-açúcar (180 dias). Os rendimentos máximos de metano foram $250,9 \text{ NmL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ (DQO, demanda química de oxigênio) e $316,0 \text{ NmL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ para o UASB I e II, respectivamente, correspondendo a 71,7% e 90,3% do rendimento máximo teórico de metano ($350 \text{ NmL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$). Assim, a geração de energia do sistema de dois estágios foi 25,7% maior do que do sistema de um único estágio, o que indicou a necessidade de uma fase acidogênica para melhorar a remoção de matéria orgânica e a extração de energia da vinhaça da cana-de-açúcar.

Venetsaneas et al. (2009) investigaram a produção fermentativa mesofílica de hidrogênio a partir de soro de queijo não diluído em um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h. A adição de alcalinidade (NaHCO_3) ou um controlador automático de pH foram usados, para manter o pH em um valor constante de 5,2. A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foi de $2,9 \pm 0,2 \text{ L L}_{\text{reator}}^{-1} \text{ d}^{-1}$, enquanto o HY produzido foi de aproximadamente $0,78 \pm 0,05 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicose}_{\text{consumida}}^{-1}$, com adição de alcalinidade, enquanto os respectivos valores ao utilizar controle de pH foram $1,9 \pm 0,1 \text{ L L}_{\text{reator}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $0,61 \pm 0,04 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicose}_{\text{consumida}}^{-1}$. Os rendimentos correspondentes de hidrogênio produzido foram $2,9 \text{ L de H}_2 \text{ L}_{\text{soro}}^{-1}$ e $1,9 \text{ L de H}_2 \text{ L}_{\text{soro}}^{-1}$, respectivamente. O efluente do reator hidrogenogênico foi posteriormente processado em um biorreator anaeróbico mesofílico contínuo. O digestor anaeróbico foi operado a um TDH de 20 d e produziu aproximadamente $1 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1}$, correspondendo a um rendimento de $6,7 \text{ L CH}_4 \text{ L}^{-1}$ de afluente. A remoção da DQO atingiu 95,3%, demonstrando que o soro de queijo pode ser utilizado de forma eficiente para a produção de hidrogênio e metano, em um processo de duas etapas.

Peixoto et al. (2012) avaliaram o potencial de uso de diferentes efluentes para a produção simultânea de H_2 e CH_4 em um processo em batelada de duas fases com microflora mista. Uma quantidade apreciável de H_2 foi produzida a partir de águas residuárias de arroz parboilizado ($23,9 \text{ mL g DQO}^{-1}$) e vinhaça ($20,8 \text{ mL g DQO}^{-1}$), enquanto outros efluentes favoreceram a geração de CH_4 . A quantidade de CH_4 produzida foi mínima para esgoto ($46,3 \text{ mL g DQO}^{-1}$), seguido por água residuária de arroz parboilizado ($115,5 \text{ mL g DQO}^{-1}$) e glicerol ($180,1 \text{ mL g DQO}^{-1}$). A quantidade máxima de CH_4 foi observada para a vinhaça ($255, \text{ mL g DQO}^{-1}$). A recuperação total de energia da vinhaça ($10,4 \text{ kJ g DQO}^{-1}$) correspondeu à redução máxima da DQO (74,7%), seguida pelo glicerol (70,38%, $7,20 \text{ kJ g DQO}^{-1}$), água residuária de arroz parboilizado (63,91%, $4,92 \text{ kJ g DQO}^{-1}$), e esgoto (51,11%, $1,85 \text{ kJ g DQO}^{-1}$). O desempenho relativamente alto da vinhaça pode ser atribuído às elevadas concentrações de

macronutrientes contidas neste despejo. As observações foram baseadas em parâmetros cinéticos de produção de H_2 e CH_4 e recuperação energética global do processo. Essas observações sugerem que efluentes ricos em compostos orgânicos podem ser utilizados para recuperação de energia com geração sequencial de H_2 e CH_4 .

Conforme citado anteriormente, grande parte dos trabalhos focam na metanogênese e produção de CH_4 , porém a acidogênese também apresenta produtos interessantes como $bioH_2$, AO e solventes. Embora o metano seja geralmente considerado o produto final de interesse para a DA, atualmente, os AO, solventes e hidrogênio gerados durante a etapa acidogênica têm ganhado atenção devido ao seu possível uso em muitas indústrias e aplicação como precursores para biocombustíveis, bioplásticos e outros ácidos de cadeia mais longa (BEVILACQUA et al., 2020; IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2020; KLEEREBEZEM et al., 2015). Os preços de mercado indicam maior lucratividade dos AO em comparação ao metano ou biogás (MOSCOVIZ et al., 2018). Como já apresentado, os AO são produzidos na etapa acidogênica e geralmente são convertidos a metano no próximo estágio. No entanto, sua utilização direta também deveria ser considerada, uma vez que estes produtos por si só possuem alto valor monetário (KLEEREBEZEM et al., 2015; ZACHAROF; LOVITT, 2013). Com base nisto, o presente estudo teve como foco principal a etapa acidogênica e seus principais produtos ($bioH_2$, AO e solventes).

3 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR FERMENTAÇÃO ESCURA

O hidrogênio é considerado um biocombustível limpo e renovável (LEITE et al., 2008; WU; ZHU e MILLER, 2013), devido a sua elevada densidade energética (122 kJ g^{-1}) em comparação com os hidrocarbonetos e a ausência de emissões de CO_x , NO_x e SO_x (DAS e VEZIROĞLU, 2001). Na digestão anaeróbia, a produção de hidrogênio por via fermentativa acontece na etapa acidogênica por meio da decomposição de substratos ricos em carboidratos, por diversos microrganismos, em hidrogênio e outros produtos, principalmente ácidos (lático, acético, butírico, etc.) e álcoois (etanol, butanol, etc.). A distribuição dos ácidos pode ser diferente dependendo do microrganismo, do estado de oxidação do substrato e das condições ambientais (pH e pressão parcial de hidrogênio) (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

A rota metabólita determina diferentes rendimentos de hidrogênio; fermentações de hexose em acetato ou butirato produzem H_2 enquanto fermentações em propionato não produzem H_2 (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017). Como pode ser observado nas Reações 1 e 2, com glicose como substrato modelo, os ácidos acético e butírico constituem mais de 80% do total de produtos finais e teoricamente os rendimentos de H_2 são de 4 e 2 mols por mol de glicose em fermentação do tipo acetato e butirato, respectivamente (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).



Embora a fermentação escura atraia uma atenção notável, ela pode levar a um rendimento moderado de H_2 , o que é um grande problema encontrado. A razão do insuficiente rendimento do gás é a coformação de metabólitos solúveis que engloba principalmente ácidos orgânicos (AO) voláteis e álcoois. Este obstáculo sério significa que uma parte considerável da energia química armazenada na matéria-prima da cofermentação é desviada para a formação de subprodutos e permanece inexplorada. Assim, esforços adicionais devem ser feitos para recuperar maior quantidade de energia do resíduo da fase líquida (efluente de fermentação) (SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

A produção dos ácidos com liberação do H_2 pode ser obtida por meio do controle operacional do sistema. Tal controle é essencial pois, enquanto uma alta concentração de substrato pode resultar em maior produção de H_2 , o acúmulo significativo de ácidos não dissociados em pH baixo pode desencadear inibição da acidogênese (MCCARTY, 1964; FORESTI, 1994). O metabolismo dos microrganismos fermentativos no sistema de fermentação escura pode ser inibido pelo excesso de substrato, micronutrientes, macronutrientes, íons metálicos, alta temperatura, pH ácido, AO não dissociados, microrganismos competitivos e substâncias tóxicas derivadas do substrato (ELBESHBISHY et al., 2017).

Os principais problemas relacionados ao processo de produção contínua de H_2 são instabilidade de biomassa, inibição por ácido propiônico (HPr) e acúmulo de H_2 . Os ácidos láctico, etanol, acético e butírico podem ser associados à produção de hidrogênio enquanto os ácidos propiônico e valérico são produzidos com o consumo de hidrogênio e de ácido láctico (SAADY, 2013; ZIARA et al., 2019). A fermentação escura do tipo propiônica não está associada à produção de hidrogênio (PERNA et al., 2013; RAMOS et al., 2019; ROSA et al., 2014), pois é uma via consumidora deste (CASTELLÓ et al., 2020; MOTA et al., 2018; RAMOS; SILVA, 2017) que produz principalmente propionato, acetato e algum valerato, sem produção significativa de biogás (CABROL et al., 2017). Outros problemas que podem ser citados é a lavagem de biomassa, controle de pH e homoacetogênese que devem ser cuidadosamente monitorados junto com os parâmetros operacionais (tempo de detenção hidráulica (TDH), carga orgânica volumétrica (COV) e temperatura). A homoacetogênese é a formação de acetato por microrganismos autotróficos (homoacetogênicos) via redução de CO_2 com H_2 . Embora tanto a acetogênese quanto a homoacetogênese produzam acetato, a primeira produz H_2 e CO_2 enquanto a segunda consome H_2 e CO_2 . Portanto, a via homoacetogênica não é desejada em sistemas que visam produção de hidrogênio e um dos desafios a serem enfrentados é determinar em quais condições ela se estabelece para que possa ser evitada (SAADY, 2013). A melhoria do período de partida do sistema também deve ser considerada para reduzir a possibilidade de falhas operacionais em prazos mais longos e, assim, ajudar a implementação de bioprocessos mais atrativos (SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

Apesar dos problemas relatados anteriormente, a produção por fermentação escura contínua de H_2 pode ser aprimorada por várias estratégias. Diversos autores descreveram esta tecnologia como promissora e relataram valores de produção volumétrica (PVH) e rendimento (HY) de H_2 satisfatórios (ALBANEZ et al., 2016; ARIMI et al., 2015; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ANZOLA-ROJAS e ZAIAT, 2016; ANZOLA-ROJAS; ZAIAT e WEVER, 2016;

AROOJ et al., 2008; BLANCO; FUESS e ZAIAT, 2017; CARRILLO-REYES et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a; 2015b; FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019; HAFEZ et al., 2009a; 2009b; LOVATO et al., 2017; 2021; MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007; PEIXOTO et al., 2011; PENTEADO et al., 2013).

Anzola-Rojas; Zaiat (2016) operaram três reatores anaeróbios de leito estruturado de fluxo descendente com diferentes materiais suporte para a fixação de microrganismos, com e sem descargas frequentes de biomassa. O pH foi mantido em aproximadamente 6,5 por meio da adição de NaHCO_3 e HCl . A produção de H_2 foi mantida continuamente por 120 dias, resultando em PVH de $0,6 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e rendimento de $0,5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$. Comparado com o reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente, houve um aumento em 10% na remoção natural de biomassa induzida pelo efluente e diminuição em 15% da biomassa acumulada no leito. Este estudo demonstrou que esta configuração de reator produziu H_2 de forma contínua e estável devido à constante renovação da biomassa. Além disso, a renovação de biomassa propiciou a maior ocorrência de microrganismos produtores de H_2 do que microrganismos não produtores ou consumidores.

Em um estudo posterior, Anzola-Rojas; Zaiat e Wever (2016) utilizaram uma estratégia de operação de variação da COV ($12\text{--}96 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (DQO, demanda química de oxigênio) para melhorar a PVH e HY de um reator anaeróbio de leito estruturado de fluxo descendente. Diferentes PVHs e HYs no reator com a mesma COV indicaram que o sistema foi impulsionado principalmente pela carga orgânica volumétrica específica (COVe). Quando a COVe foi mantida entre 3,8 e 6,2 g de sacarose $\text{g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$, as taxas volumétricas aumentaram de 0,1 para $8,9 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e os rendimentos ficaram estáveis em torno de $2,0 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{convertida}}$. Além disso, o hidrogênio foi produzido principalmente por meio da fermentação do tipo etanol, levando a uma eficiência energética total de $23,40 \text{ kJ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ com base na produção de hidrogênio e etanol.

Hafez et al. (2009a) investigaram o impacto de seis COV variando de 6,5-206 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ no desempenho de um novo sistema compreendendo um reator de mistura para produção biológica de hidrogênio, seguido por um decantador de gravidade descoberto para desacoplar o tempo de detenção de sólidos (TDS) do TDH. O pH foi mantido na faixa de 5,5-6,5. O sistema foi capaz de manter um alto HY de $2,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose}$ em uma COV variando de 6,5-103 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mas decresceu para aproximadamente 1,2 e 1,1 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose}$ para as COVs de 154 e 206 g DQO $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Uma correlação estatística positiva foi

observada entre a produção molar de hidrogênio e a relação molar acetato-butirato. O rendimento de biomassa correlacionou-se negativamente com o HY, embora não linearmente.

Peixoto et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias de refrigerantes em dois reatores anaeróbios de leito fixo de fluxo ascendente. Os dados de ambos os reatores indicaram que o reator sem meio contendo macro e micronutrientes (R2) proporcionou um maior HY (3,5 mol H₂ mol⁻¹ de sacarose) em comparação com o reator (R1) com um meio contendo nutrientes (3,3 mol H₂ mol⁻¹ de sacarose). O reator R2 produziu hidrogênio continuamente, enquanto o reator R1 exibiu um curto período de produção e produziu menores quantidades de hidrogênio. Melhores PVHs e porcentagens de biogás também foram observadas para o reator R2, que produziu 0,4 L h⁻¹ L⁻¹ e 15,8% de H₂, em comparação com o reator R1, que produziu 0,2 L h⁻¹ L⁻¹ e 2,6% de H₂. A diferença no desempenho entre os reatores foi provavelmente devido a mudanças na via metabólica para a produção de hidrogênio e diminuições na porosidade do leito como resultado do crescimento excessivo de biomassa no reator R1. As análises empregando técnicas de biologia molecular de amostras dos reatores R1 e R2 indicaram a presença de vários microrganismos, incluindo *Clostridium* (91% de similaridade), *Enterobacter* (93% de similaridade) e *Klebsiella* (97% de similaridade).

Arooj et al. (2008) investigaram a produção contínua de biohidrogênio em um reator de mistura utilizando amido de milho como substrato por 158 dias. O reator foi inoculado com lodo de comunidade mista de um digestor anaeróbio em uma estação de tratamento de esgoto sanitário. O pH foi mantido em 5,3 usando um controlador. O perfil de ácidos apoiou o fato de que a razão butirato para acetato (B/A) foi o parâmetro mais importante para justificar o HY em vários TDHs. O rendimento máximo de hidrogênio de 0,92 mol H₂ mol glicose_{adicionado}⁻¹ foi observado em um TDH de 12 h com a maior razão B/A de 4,3. Além disso, a modelagem de estimativa para quantificar a atividade homoacetogênica foi conduzida e a produção de acetato que consumia H₂ em vários TDHs foi estimada. A modelagem de estimativa revelou que a razão B/A desempenha um papel significativo no rendimento de H₂ em TDHs mais longos, ou seja, 18, 15 e 12 h. O efeito da produção de hidrogênio por meio da via do acetato foi insignificante em TDHs curtos, ou seja, 9, 6 e 4h. Portanto, em vez da razão B/A, o deslocamento de produção de butirato sozinho governa o rendimento de hidrogênio em TDHs curtos.

É muito importante destacar que todos os estudos mencionados anteriormente utilizaram algum tipo de ajuste de pH. A faixa de pH desejada para reatores produtores de hidrogênio varia de 4,5-6,5. Diversos estudos em reatores anaeróbios com valores de pH abaixo de 4,5-4,0

apresentam dados que mostram a inibição ou a redução drástica da produção de hidrogênio (ARIMI et al., 2015; CHEN et al., 2005; CHOJNACKA et al., 2011; KIM et al., 2004; LAY, 2000; LEE; MIYAHARA; NOIKE, 2002; LIU; SHEN, 2004; MIZUNO et al., 2000; RUGGERI; TOMMASI; SANFILIPPO, 2015). No entanto, contradizendo os dados publicados na literatura que relatam inibição da produção de H₂ em pH menor que 4,0, o estudo conduzido por Mota et al. (2018) no grupo de pesquisa em Processos Anaeróbios, no Laboratório de Processos Biológicos/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo (LPB/EESC/USP), demonstrou a possibilidade de produção de H₂ estável e a longo prazo em reatores contínuos. Os autores relataram PVH média de 175 ± 44 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹ e rendimento (HY) de $3,3 \pm 0,7$ mol H₂ mol⁻¹sacarose_{consumida}. Tais resultados foram obtidos em um segundo experimento quando o TDH foi aumentado de 3,3h para 4,6, resultando em uma alteração da COV de 33 para 25 g DQO L⁻¹ d⁻¹, em um valor de pH médio de 2,7. Tais condições favoreceram a redução da formação de lactato, maiores concentrações de acetato e etanol, além de maior consumo da sacarose.

A operação de reatores acidogênicos em condições extremamente ácidas pode ser extremamente vantajosa. Tal estratégia dispensa o uso de agentes químicos reguladores de pH ou mesmo recirculação de efluente para aproveitamento da alcalinidade. Isso representa uma alta economia monetária ao dispensar a necessidade de compra de produtos químicos ou gastos com energia elétrica. Outra grande vantagem é que baixos valores de pH podem promover a completa inibição de microrganismos metanogênicos durante a operação ou no lodo de inóculo que muitas vezes requer pré-tratamento térmico ou ácido.

Alguns autores relatam problemas para inibir totalmente a metanogênese em reatores acidogênicos. Castelló et al. (2009) examinaram a viabilidade de produção de hidrogênio por fermentação escura usando soro de queijo não esterilizado em um reator UASB. Os resultados mostraram que o hidrogênio foi produzido, mas em pequenas quantidades (122 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ para uma COV de 20 g DQO L⁻¹ d⁻¹). A manutenção do pH baixo (média = 5) foi insuficiente para controlar a metanogênese; o metano foi produzido concomitantemente com o hidrogênio, sugerindo que a biomassa metanogênica se adaptou mesmo nestas condições de pH. Carrillo-Reyes et al. (2014) analisaram a estrutura da comunidade microbiana durante a aplicação de estratégias operacionais para diminuir a produção de metano, em três diferentes reatores produtores de hidrogênio de manta de lodo anaeróbio de fluxo ascendente. Os resultados mostraram que organismos homoacetogênicos relacionados a *Blautia hydrogenotrophica* e *Oscillibacter valericigenes*, e o produtor de hidrogênio *Enterobacter aerogenes* foram favorecidos

durante estratégias de redução de pH (5,6 a 4,5). O incremento da COV de 20 para 30 g DQO L⁻¹ d⁻¹ selecionou produtores de hidrogênio semelhantes a *Clostridium tyrobutyricum*, *Citrobacter freundii* e *E. aerogenes*; incrementos adicionais causaram inibição da produção de hidrogênio devido à alta concentração de ácidos não dissociados. A produção de metano foi inibida completamente apenas quando a biomassa do reator foi tratada termicamente pela segunda vez, estratégia essa que selecionou produtores de hidrogênio capazes de esporular, mas os homoacetogênicos também foram favorecidos.

Penteado et al. (2013) investigaram a influência de diferentes fontes de lodo de inóculo e métodos de pré-tratamento na produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios de leito fixo de fluxo ascendente alimentados com sacarose. As seguintes fontes de inóculo foram incluídas no estudo: lodo de um reator UASB utilizado para tratar águas residuárias de abatedouro de aves (SI), lodo de um reator UASB usado para tratar águas residuárias de suinocultura (Sw) e autofermentação (A). Choque térmico (He) e ácido (Ac) foram usados para aumentar a produção de hidrogênio e suprimir o consumo de hidrogênio. Os rendimentos médios de hidrogênio (HY) no experimento foram 2,1 (A), 2,0 (SIHe), 2,0 (SIAc), 1,0 (SI), 1,0 (SwAc), 0,7 (SwHe) e 0,7 (Sw) mol H₂ mol⁻¹ sacarose. Embora o choque térmico tenha produzido o valor máximo de HY (SIHe), o pré-tratamento ácido (SIAc) resultou em uma produção de hidrogênio mais estável com o maior valor médio, o que poderia ser uma vantagem do uso de choque de pH. O processo de autofermentação apresentou valores de HY semelhantes aos produzidos com pré-tratamento ácido SIAc e choque térmico SIHe, tornando-o um lodo de inóculo adequado para a produção de biohidrogênio, pois não foi necessário pré-tratamento.

Os resultados apresentados por Mota et al. (2018) são extremamente promissores diante dos problemas apresentados para a produção de H₂ a partir da fermentação escura de resíduos e efluentes, porém é muito importante destacar que os autores utilizaram um substrato simples constituído de sacarose (açúcar demerara orgânico Native®) acrescido de uma solução de macro e micronutrientes descrita por Jeison (2007). Por isso, é de extrema importância que tal estratégia de operação em condições extremamente ácidas e sem qualquer ajuste de pH seja avaliada para águas residuárias reais e complexas. Diante desta necessidade, este estudo avaliou a produção de hidrogênio em reatores acidogênicos alimentados com soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar. Tais efluentes foram escolhidos por serem águas residuárias reais e complexas, e conforme amplamente descrito na literatura, apresentam potencial de produção de H₂ por fermentação escura. No entanto, necessitam de suplementação de alcalinidade para que isso ocorra.

A produção de AO e solventes também será avaliada neste estudo, além de H₂, pois como mencionado no capítulo anterior, são outros produtos da etapa acidogênica de grande valor agregado. Tradicionalmente, os AO são derivados de fontes de combustíveis fósseis por meio de rotas químicas. No entanto, devido à escassez que os recursos globais de petróleo enfrentam e a consciência crescente do impacto ambiental que a economia baseada no carbono criou, métodos alternativos de produção de AO têm sido cada vez mais buscados. Estes métodos incluem fermentação, digestão anaeróbia e recuperação desses ácidos a partir de resíduos industriais (BHATIA e YANG, 2017; ZACHAROF e LOVITT, 2013). Estudos recentes têm avaliado a produção biológica de AO e solventes a partir de resíduos e efluentes por fermentação escura (ASUNIS et al., 2019; CASTILLA-ARCHILLA; PAPIRIO e LENS, 2021; ENG SÁNCHEZ et al., 2021; FRA-VÁZQUEZ et al., 2020; IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2019; 2020; IGLESIAS-IGLESIAS; KENNES e VEIGA, 2020; LUONGO et al., 2019; MICOLUCCI et al., 2020; PATEL et al., 2021; ZHANG et al., 2020).

Micolucci et al. (2020) avaliaram a operação de longo prazo de um reator anaeróbio em escala piloto de duas fases para a produção simultânea de ácidos graxos voláteis (AGV), hidrogênio e metano no tratamento de resíduos alimentares de origem urbana. O método de controle otimizado foi estabelecido com base em três sondas online: um medidor de pH no reator de fermentação, um medidor de pH e uma sonda de condutividade no reator de digestão. O primeiro nível de controle gerenciava o pH no reator de fermentação, enquanto o segundo nível de controle gerenciava a concentração de amônia no reator de digestão. Essa combinação estabeleceu o volume do resíduo digerido a ser reciclado da digestão para o reator de fermentação, otimizando o rendimento de AGV ($0,31-0,32 \text{ kg DQO}_{AGV} \text{ kg DQO}^{-1}_{alimentada}$) e a produção específica de hidrogênio ($0,070-0,074 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \text{ kg SVT}^{-1}_{alimentados}$) no reator de fermentação, e a produção específica de metano ($0,48-0,55 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg SVT}^{-1}_{alimentados}$) no reator de digestão. Em uma nova configuração do processo, parte da corrente de líquido rico em ácidos graxos voláteis do efluente do fermentador foi removida, mantendo o efluente rico em sólidos correspondente em todo o sistema (como alimentação para o reator de digestão). Desta forma, a concentração de AGV no digestor foi mantida em um nível baixo, mesmo com altas COVs, mantendo uma eficiência satisfatória de produção de metano ($\sim 0,50 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg SVT}^{-1}_{alimentados}$) e utilizando o excesso de AGV (fora do sistema) para outros fins. O método de controle otimizado de dois estágios para o tratamento anaeróbio de resíduos alimentares fornece novas perspectivas de valorização desse resíduo.

Zhang et al. (2020) investigaram o efeito dos tipos de resíduos vegetais no desempenho da produção de AGV em um reator anaeróbio em batelada com agitação contínua a 37 ° C, com 4,5% de sólidos totais (ST). Os vegetais selecionados foram cascas de batata, cenoura, aipo e repolho chinês. Um rendimento de AGV de 452 mg DQO g SV⁻¹ alimentados foi obtido a partir de cascas de batata, que foi 40,1%, 21,5% e 124,9% maior do que o rendimento a partir da cenoura, aipo e repolho chinês, respectivamente. A rápida acidificação da cenoura causou um declínio acentuado no pH e levou à inibição da produção de AGV. A acidificação do aipo começou lentamente, e o rendimento do ácido hexanóico aumentou rapidamente no estágio mais avançado da fermentação. O rendimento de AGV do repolho chinês foi inibido devido ao baixo pH inicial, mas a concentração de etanol atingiu 7577 mg DQO L⁻¹. De acordo com o perfil de AGV, a fermentação de cascas de batata, cenoura, aipo e repolho chinês pode ser classificada como via metabólica do tipo propionato, butirato, ácido misto e etanol-acetato, respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que uma combinação adequada de tipos de resíduos vegetais é importante para a produção seletiva de AGV.

Iglesias-Iglesias; Kennes e Veiga (2020) exploraram a produção de AGV por meio da codigestão anaeróbia de lodo de esgoto (SS) e soro de queijo (CW). Dois experimentos em batelada foram conduzidos para avaliar o efeito da proporção de mistura do substrato (SS%: CW% da DQO total da matéria-prima) e o pH inicial na fermentação acidogênica de SS com CW em diferentes temperaturas. O experimento da primeira batelada mostrou que uma diminuição da proporção de SS na codigestão com CW levou a maior acidificação observando um efeito sinérgico em uma proporção de mistura SS: CW de 25:75 (SS25: CW75). No experimento da segunda batelada, três temperaturas (30°C, 38°C e 50°C) e dois valores iniciais de pH (5,5 e 9) foram estudados nas relações de mistura de substrato SS60: CW40 e SS25: CW75. Graus máximos de acidificação de 56% e 73% foram alcançados, a 50°C e pH inicial de 5,5, para as relações de mistura do substrato SS60: CW40 e SS25: CW75, respectivamente. Finalmente, o desempenho de um reator semicontínuo foi demonstrado em escala de laboratório. Foram estudados diferentes tempos (10 e 20 dias), pH (não controlado, 5,5 e 9) e o efeito de um pré-tratamento térmico do SS. O grau máximo de acidificação no reator em escala de laboratório foi de 45% a 37°C, TDH de 20 dias e pH de 5,5. Nessas condições, o perfil de AO foi dominado pelos ácidos butírico e acético.

Por estes trabalhos, verifica-se que a produção de AO e solventes por fermentação escura de resíduos e efluentes é uma tecnologia bastante recente e que demanda maior investigação. Maior produtividade e principalmente seletividade precisa ser alcançada. Estudos

da produção de AO baseados no uso de açúcares puros (e.g. glicose e xilose) apresentam uma maior produtividade com minimização de subprodutos (FENG et al., 2010; ZHU e YANG, 2004). Porém, as vantagens de uma maior produtividade e rendimento de tais processos podem ser anuladas pelo maior custo das matérias-primas (ZACHAROF; LOVITT, 2013). O uso de resíduos e águas residuárias elimina tais custos, porém tais substratos são muito mais complexos e sua composição é formada não apenas por açúcares, mas por um conjunto de frações diferentes (carboidratos, proteínas, lipídeos, compostos inorgânicos, sólidos, entre outros). Diante desta carência de pesquisas com substratos complexos derivados de águas residuárias reais, o presente estudo avaliou a produção de AO e solventes com três águas residuárias distintas: o soro de queijo, vinhaça de cana-de-açúcar e água de cozimento de atum em conserva (efluente rico em proteínas).

4 PROCESSAMENTO DE SORO DE QUEIJO EM REATORES ACIDOGÊNICOS

O soro de queijo é considerado um dos mais importantes e valiosos subprodutos gerados na indústria de laticínios, não só devido a sua alta carga orgânica, mas também pelo grande volume gerado que está relacionado à produtividade de queijo, que por sua vez está relacionada ao tipo de leite que é processado (CARVALHO; PRAZERES e RIVAS, 2013). O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de leite com uma produção em 2020 de aproximadamente 26.505.000 toneladas métricas e uma produção de queijo de 750.000 toneladas métricas (USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF, 2020). As indústrias lácteas geram muitos resíduos, e apesar de atualmente o soro não poder mais ser considerado um resíduo, é importante que seja dada a devida atenção a sua geração devido ao seu grande volume (cerca de 80 a 90% do volume do leite).

De acordo com Rech (2003), o soro de queijo é um subproduto formado pelo líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijo e pode ser classificado como um efluente devido à sua baixa concentração de matéria sólida (6 a 7%). O soro de queijo pode ter outros usos, porém, quando não há o conhecimento técnico, nem o incentivo econômico para fazê-los, é essencial considerar o seu tratamento antes do lançamento em um corpo d'água (MOCKAITIS et al., 2006). Apesar de grande parte das indústrias aproveitarem o soro de queijo para produção de ricota, isso pode variar de acordo com o processo empregado e uma parte pode se tornar água residuária. A indústria produtora de queijo é responsável por três principais tipos de efluentes; soro de queijo (resultante da produção de queijo), soro de queijo secundário (resultante da produção de queijo cottage) e a água de lavagem de dutos, armazenamento e tanques que gera águas residuárias chamadas de efluente de soro de queijo. Este último efluente também contém diferentes frações de soro de queijo e soro de queijo secundário (PRAZERES; CARVALHO e RIVAS, 2012).

O soro de queijo contém 55% dos nutrientes do leite e é composto principalmente de açúcares (lactose, 70-72% do extrato seco), proteínas (8-10%), sais minerais (12-15% do extrato seco) e lipídios (0,4 a 0,5%) (GHALY; KAMAL, 2004; KISAALITA; LO; PINDER, 1990; PANESAR et al., 2007). A carga orgânica do soro de queijo equivale a 100 vezes a carga poluidora do esgoto sanitário (METCALF; EDDY, 2003; MOCKAITIS et al., 2006) e um grande número de microrganismos não conseguem utilizá-lo como uma fonte de carbono

(SISO, 1996). A razão demanda bioquímica de oxigênio/demanda química de oxigênio (DBO/DQO) é normalmente acima de 0,5 constituindo um substrato facilmente degradável por digestão anaeróbia ou aeróbia (PRAZERES; CARVALHO e RIVAS, 2012).

Os principais parâmetros do soro de queijo são uma DBO na faixa de 27-60 g L⁻¹, uma DQO de 50-102 g L⁻¹, valores de SST (sólidos em suspensão totais) dentro de 1,3-22,0 g L⁻¹, e como consequência do tipo de soro produzido no processo e a adição de NaCl (cloreto de sódio) durante a produção de queijo, o soro apresenta uma alta salinidade (condutividade de aproximadamente 8 mS.cm⁻¹) (PERNA et al., 2013). O soro de queijo também apresenta outros componentes, tais como ácidos cítricos e lácticos (0,02-0,05%), compostos nitrogenados não-proteicos (ureia e ácido úrico), e vitaminas do grupo B (BILBAO, 1981; PANESAR et al., 2007; KOSIKOWSKI e WIERZBICKI, 1973; KOSIKOWSKI, 1979). A concentração de nitrogênio (0,2-1,76 kg m⁻³) e fósforo (0,124-0,54 kg m⁻³) no soro de queijo, pode representar um risco considerável para a eutrofização quando lançado sem tratamento em corpos d'água (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Estudos indicam que o processo anaeróbio é método mais viável de tratamento de efluente com alta carga da indústria do queijo (GAVALA et al., 1999; GUTIÉRREZ; ENCINA e FDZ-POLANCO, 1991; HAWKES; DONNELLY e ANDERSON, 1995; SAYED et al., 1988). No entanto, sua baixa capacidade tampão causa rápida acidificação em tratamentos biológicos (PERNA et al., 2013) e a degradação biológica do soro de queijo é caracterizada por uma operação instável que necessita de suplementação de alcalinidade durante o período de partida do sistema (GUTIÉRREZ; ENCINA e FDZ-POLANCO, 1991) ou durante o processo (GAVALA et al., 1999; YANG; YU; HWANG, 2003). Para sistemas anaeróbios com biomassa autoimobilizada empregados no tratamento de efluentes de laticínio, há uma mudança da biomassa granular para a floculenta ao longo do tempo. Outro problema frequentemente relatado na literatura é uma redução expressiva do rendimento de conversão real do soro a H₂ em relação ao rendimento teórico (CASTELLÓ et al., 2018; MARQUES et al., 2019; MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018; PERNA et al., 2013; RAMOS; SILVA, 2017; 2018).

A fermentação da lactose é descrita pelas Reações 3 e 4 com um rendimento respectivo de 8 e 4 mols de hidrogênio. No entanto, a existência de produtos finais reduzidos do processo de fermentação, competindo pelas rotas metabólicas com consumo de H₂, bem como frações de substrato não degradadas reduzem significativamente o rendimento de conversão real em comparação com o rendimento teórico (GIOANNIS et al., 2014).



Castelló et al. (2018) operaram um reator de mistura com soro de queijo cru com carga orgânica volumétrica (COV) de 30 g DQO L⁻¹ d⁻¹ por 30 dias. A produção de hidrogênio variou significativamente com valores máximos para produção volumétrica (PVH) e rendimento (HY) de H₂ de respectivamente 0,8 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 0,9 mol de H₂ por mol de lactose consumida. Os autores utilizaram diferentes ferramentas microbiológicas para analisar as causas da instabilidade da produção e concluíram que os diferentes efeitos de intensificação e inibição da produção de hidrogênio pelas bactérias lácticas e sua alta abundância poderiam explicar tais resultados.

Blanco (2018) operou reatores anaeróbios de leite estruturado com soro de queijo e os valores máximos atingidos para HY e PVH foram de 1,1 mol H₂ mol⁻¹ lactose e 1,9 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Tais resultados foram obtidos com uma carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) de 50 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 h. Neste estudo, embora tenha ocorrido produção contínua de H₂ na fase acidogênica, o rendimento obtido foi baixo, mesmo adotando estratégia de descarte periódico de lodo e com pH na faixa entre 5,0 e 6,0.

Perna et al. (2013) testaram uma configuração de reator de leite empacotado anaeróbio de fluxo ascendente para produzir hidrogênio usando soro de queijo como substrato. Três diferentes COVs de 22, 33 e 37 g DQO L⁻¹ d⁻¹ foram usadas em um TDH de 24 h. O aumento da COV do valor inicial de 22 para 37 DQO L⁻¹ d⁻¹ e o ajuste do pH para valores superiores a 5,0 tiveram efeito positivo na produção de hidrogênio e valores de até 1 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ foram alcançados. A produção de hidrogênio foi estável em todas as condições investigadas, e os problemas frequentemente relatados neste tipo de reatores (obstrução do leite, metanogênese e produção de solventes) não foram observados durante a operação. No entanto, o maior HY foi de 1,1 mol H₂ mol⁻¹ lactose, bem abaixo do valor máximo teórico (8 H₂ mol⁻¹ lactose).

Diversas pesquisas apontam o potencial do soro de queijo para a produção de hidrogênio a partir da sua fermentação escura (ANTONOPOULOU et al., 2008; ASUNIS et al., 2019; CASTELLÓ et al., 2009; CHATZIPASCHALI et al., 2012; COLOMBO et al., 2019; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009; GIOANNIS et al., 2014; GOMEZ-ROMERO et al., 2014; LIMA et al., 2015; LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; LOVATO et al., 2017; 2021; MARQUES et al.,

2019; MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018; RAMOS et al., 2019; ROSA et al., 2014; VENETSANEAS et al., 2009).

Ramos et al. (2019) avaliaram os efeitos do TDH (8 -0,25 h) na produção simultânea de hidrogênio e metano a partir do soro de queijo (5000 mg de carboidratos L⁻¹) em um reator de leito de lodo granular expandido mesofílico (30°C). A produção de hidrogênio aumentou à medida que a produção de metano diminuiu com a diminuição do TDH de 8 para 0,25 h. O HY máximo de $3,2 \pm 0,3$ mL H₂ g DQO⁻¹ aplicada e a PVH de 1951 ± 171 mL H₂ d⁻¹ L⁻¹ foram observados para TDH de 0,25 h.

Lovato et al. (2021) avaliaram três estratégias de partida modificando apenas a concentração e a temperatura do afluente em um reator anaeróbico de leito estruturado operado em bateladas sequenciais alimentado com soro de queijo: (i) alta temperatura (55 °C) e alta COV (15 kg DQO m⁻³ d⁻¹) logo no início da operação; (ii) aumento lento da temperatura até 55 °C mantendo a mesma COV e (iii) aumento lento da temperatura e COV até a condição desejada. A estratégia (iii) aumentou a produtividade de hidrogênio em 39% em relação às demais, o sistema atingiu 149,9 mol H₂ m⁻³ d⁻¹ a 33 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Esta condição também foi capaz de manter 71% de conversão de carboidratos ao longo da operação, alcançando 3,0 mol H₂ mol_{carboidratos}⁻¹. A rota de oxidação do acetato só se tornou espontânea na condição iii para a estratégia de partida em uma DQO afluente de 12375 mg L⁻¹. Isso se deve ao pH mais baixo, que aumenta a concentração de H⁺ e desloca o equilíbrio da reação para a formação de produtos (H₂ e CO₂), e a baixas concentrações de saturação desses gases em solução aquosa. Isso é mais vantajoso para o processo de produção de H₂, pois favorecer essa reação consome ácido acético e produz hidrogênio e, conseqüentemente, minimiza a reação inversa (homoacetogênese). Os autores concluíram que aumentar lentamente a concentração do afluente (1 g DQO dia⁻¹) para atingir uma certa COV é uma estratégia de partida barata que aumentou com sucesso a produtividade de hidrogênio e o rendimento do sistema. A combinação de alta temperatura e baixo pH favoreceu termodinamicamente as rotas produtoras de H₂, especialmente a rota de oxidação do acetato.

Marques et al. (2019) estudaram o efeito do TDH na produção de bioH₂ por fermentação escura usando um reator anaeróbico de leito fluidizado alimentado com soro de queijo reconstituído. O reator de 1,2 L foi operado com uma concentração aproximada de carboidratos de 2800 mg L⁻¹ e TDHs de 6, 4, 2, 1 e 0,5 h. Os ácidos acético e butírico foram os principais metabólitos produzidos no reator. A produção de H₂ aumentou de 0,039 para 1,43 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ no reator à medida que o TDH diminuiu de 6 para 0,5 h. O melhor HY (2,73 mol H₂ mol⁻¹

carboidrato) e consumo de carboidratos (81,02%) foram alcançados em um TDH de 6 h (12,34 kg DQO m⁻³ d⁻¹) seguido pelo HY de 2,43 mol H₂ mol⁻¹ carboidrato a um TDH de 0,5 h (163,02 kg DQO m⁻³ d⁻¹). Um aumento do pH afluente de valores em torno de 4,0 para valores em torno de 5,0 na fase operacional com TDH de 0,5 h, favoreceu a produção de hidrogênio apesar da redução da conversão de carboidratos em relação à fase com TDH de 6 h. Em ambas as condições, o reator apresentou a maior quantidade de ácido acético, o que favoreceu a produção de hidrogênio.

Antonopoulou et al. (2008) utilizaram um sistema de dois estágios para investigar o potencial de produção de hidrogênio e subsequente de metano a partir de soro de queijo cru a 35°C. O processo fermentativo de produção de hidrogênio a partir do soro de queijo foi conduzido em um reator contínuo de tanque agitado, operado em TDH de 24 h. A produção contínua de hidrogênio foi sustentada pela microflora já contida no soro de queijo cru, pois o reator não foi inoculado com nenhuma fonte de microrganismos. A produção de hidrogênio foi de 7,53 L H₂ d⁻¹, enquanto o HY foi de 0,041 m³ H₂ kg DQO⁻¹ adicionada ou 2,49 L H₂ L⁻¹ de soro de queijo. O efluente gerado na primeira etapa foi posteriormente digerido a biogás em um biorreator compartimentado. Este trabalho demonstrou que a produção de biohidrogênio a partir de soro de queijo pode ser acoplada de forma muito eficiente com a produção de metano em uma etapa subsequente.

Colombo et al. (2019) utilizaram uma abordagem de bioprocessamento em duas etapas. A produção de biohidrogênio via fermentação escura e produção de polihidroxialcanoatos (PHA) por culturas microbianas mistas foi proposta para valorizar duas correntes de resíduos lácteos provenientes da desproteinização do soro de queijo (ou seja, produção de ricota e ultrafiltração). Na primeira etapa foi testado o aumento da COV, resultando em maior volume diário de H₂ (3,47 e 5,07 L H₂ d⁻¹ para soro de queijo secundário (SCW) e permeado de soro de queijo concentrado (CCWP)) e produção de ácidos orgânicos (AO) (14,6 e 12,6 g L⁻¹ d⁻¹ para SCW e CCWP) para ambos os substratos, mantendo boa conversão de açúcares em H₂ (1,37 e 1,93 mol H₂ mol⁻¹ açúcares para SCW e CCWP).

Asunis et al. (2019) conduziram testes de fermentação escura em batelada com soro de queijo de ovelha sem adição de inóculo em diferentes valores de pH, relacionando o tipo e os rendimentos de produção dos subprodutos gasosos e líquidos observados com a evolução da fermentação. A fermentação do soro de queijo evoluiu ao longo do tempo em duas etapas, envolvendo uma conversão inicial de carboidratos em ácido láctico (HLA), seguida pela degradação deste em produtos solúveis e gasosos, incluindo ácidos graxos de cadeia curta

(principalmente ácidos acético (HAc), butírico (HBu) e propiônico (HPr)) e hidrogênio. Os seguintes rendimentos máximos foram alcançados: 65 g HLa L⁻¹ (pH 6,0, 45 h); 5,2 L H₂ L⁻¹, 13,8 g HBu L⁻¹, 6,8 g HPr L⁻¹ (pH 6,0, 168 h). O pH afetou a cinética de produção e rendimentos, bem como as vias de fermentação. Variando a duração do processo de fermentação, diferentes estratégias de aproveitamento do soro de queijo podem ser aplicadas e orientadas para a produção principal de ácido láctico, hidrogênio ou outros AO.

Conforme relatado por Colombo et al. (2019) e Asunis et al. (2019), além do grande potencial do soro de queijo para a produção de bioH₂ na etapa acidogênica, a produção de AO e solventes a partir deste efluente também pode ser vantajosa. Outros estudos também mostram a viabilidade da produção de AO e solventes a partir da fermentação escura do soro de queijo (ARASARATNAM; SENTHURAN e BALASUBRAMANIAM, 1996; LAGOA-COSTA; KENNES e VEIGA, 2020; LOPES; RAMOS e SILVA, 2017; LUONGO et al., 2019; RAMOS; SILVA, 2017; TANGO e GHALY, 1999; YANG; YU e HWANG, 2003)

Lagoa-Costa; Kennes e Veiga (2020) exploraram a otimização da produção de ácidos graxos voláteis (AGV) a partir de soro de queijo em um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais. Para tanto, foram aplicadas alterações dos tempos de detenção de sólidos (TDS) e TDHs. Por meio dos resultados foi possível notar um aumento da eficácia do processo em TDS mais alto e TDH mais baixo. O grau de acidificação melhorou de 0,73 para 0,83 ao aumentar o TDS de 5 para 15 dias e de 0,79 para 0,83 ao diminuir a TDH de 3 para 1 dia. O rendimento de acidificação ($Y_{AGV/S}$) melhorou de 0,78 para 0,87 e de 0,86 para 0,90 g DQO_{AGV} g DQO⁻¹_{lactose} ao aumentar o TDS de 5 para 15 dias e diminuir o TDH de 3 para 1 dia, respectivamente.

Yang; Yu e Hwang (2003) conduziram um conjunto de experimentos para a produção de AGV em reatores de mistura com efluentes de soro de queijo. A produção máxima de ácido acético e butírico associada a mudanças simultâneas no TDH, pH e temperatura foi investigada. O grau de acidificação do soro a AGV de cadeia curta foi inferior a 20% da DQO afluente. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada com sucesso para determinar as condições fisiológicas ótimas nas quais ocorreram as máximas produções de ácido acético (TDH de 0,40 d, pH 6,0 a 54,1°C) e butírico (TDH de 0,22 d, pH 6,5 a 51,9°C). Foi operado um processo termofílico de dois estágios com a acidificação parcial seguida de uma etapa de metanização. As condições ótimas para a produção de ácido acético foram selecionadas para acidificação parcial de efluentes de soro de queijo por causa de uma taxa mais alta na produção combinada de ácidos acético e butírico do que em condições ótimas para a produção de ácido butírico. O desempenho do processo de dois estágios foi comparado ao do sistema anaeróbio de estágio

único. O processo de dois estágios mostrou claramente um melhor desempenho no gerenciamento de efluentes de soro de queijo em relação ao sistema único com taxas máximas respectivas de remoção de DQO e produção de metano 116% e 43% superiores às do sistema único.

Tango e Ghaly (1999) utilizaram um biorreator de mistura contínua de 5 L para investigar o efeito da temperatura no crescimento de *Lactobacillus helveticus* e na produção de ácido láctico a partir da lactose. As temperaturas testadas foram 23 °C (sem controle), 37 °C (sem controle), 37 °C (controlado) e 42 °C (controlado). Nenhum controle de pH foi fornecido. A temperatura e o pH foram monitorados durante o processo de fermentação. O pH diminuiu constantemente do valor inicial de 4,4 para menos de 3,0, devido à formação de ácido láctico. O aumento da temperatura de fermentação de 23°C para 42°C (sem controle de pH), aumentou a utilização de lactose e a produção de ácido láctico em 26,6% e 6,2 g L⁻¹, respectivamente. A taxa de crescimento específica máxima, utilização de lactose e produção de ácido láctico foram 0,25 h⁻¹, 60,6 % (da concentração inicial) e 10,0 g L⁻¹ respectivamente, para fermentação com controle de temperatura a 42°C. Através dos resultados foi identificada a necessidade de controlar a temperatura e o pH durante a fermentação láctica do soro de queijo em batelada para evitar perdas de rendimento.

Os diversos estudos citados neste capítulo reforçam o grande potencial do soro de queijo para a produção de bioH₂ e AO por meio da fermentação escura. No entanto, é muito importante destacar que quase todos estes estudos relataram a suplementação de alcalinidade como essencial para que o processo ocorra de forma estável. O soro apresenta-se como um efluente que necessita de melhores estratégias, não só para a melhora do desempenho da produção de bioH₂, que não tem apresentado rendimentos satisfatórios, mas especialmente em relação à necessidade de alcalinização que o processamento de tal efluente demanda. Diante disto, a descoberta feita por Mota et al. (2018), que indica a viabilidade de produção contínua e com rendimentos satisfatórios de bioH₂ sem adição de alcalinizantes e em pH abaixo de 3,0, mostrou-se promissora para o soro de queijo.

5 PROCESSAMENTO DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATORES ACIDOGÊNICOS

A indústria de açúcar e etanol é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, sendo a vinhaça o principal resíduo, com volume gerado de 10-15 L de vinhaça por litro de etanol produzido (FUESS; GARCIA, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; REIS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2010). Na safra de 2019/2020, o Brasil atingiu a maior produção de etanol da história, com um total de 34 bilhões de litros (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2020). Grandes quantidades de vinhaça são produzidas todos os anos no Brasil e atualmente, a fertirrigação é o principal destino da vinhaça por ser uma solução mais simples e barata, além de ser vantajosa devido à sua alta concentração de nutrientes, principalmente potássio. A aplicação deste resíduo no solo também é sustentada por uma norma técnica regulamentada no Estado de São Paulo, na qual a principal restrição é o teor de potássio ($400 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, 2015; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015).

No entanto, um grande problema da aplicação contínua e sem cautela da vinhaça no solo, é que o grande volume desencadeia uma série de efeitos ambientais na área plantada (FUESS; GARCIA e ZAIAT, 2018; FUESS e GARCIA, 2014; MORAES; ZAIAT e BONOMI, 2015). Os impactos ambientais incluem: (i) contaminação do solo e água subterrânea (CRUZ; RIGHETTO e NOGUEIRA, 1991; LYRA; ROLIM e SILVA, 2003), (ii) lixiviação e salinização (MADRID e DÍAZ-BARRIENTOS, 1998; RIBEIRO et al., 2010), (iii) inibição de germinação de sementes (DÍAZ et al., 2002; MADRID e DÍAZ-BARRIENTOS, 1998) e (iv) a proliferação de “mosca-do-estábulo” (*Stomoxys calcitrans*) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). Este último efeito é um problema local que segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2015) atinge áreas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, alterando o comportamento de animais bovinos e equinos, incluindo reduções no ganho de peso e na produção de leite.

A vinhaça se caracteriza como um efluente complexo que apresenta alto conteúdo orgânico ($22\text{-}45 \text{ g DQO L}^{-1}$), pH baixo, alta temperatura, alto conteúdo de cinzas (ALBANEZ et al., 2016), presença de certos compostos recalcitrantes, entre eles pode-se citar um pigmento castanho escuro, denominado melanoidina, principal responsável pela coloração marrom escura apresentada pela vinhaça (SEIXAS; GIMENES e FERNANDES-MACHADO, 2016) e outros

componentes como compostos fenólicos, açúcares e melanina que também causam cor no efluente de destilaria (PANT e ADHOLEYA, 2007).

Várias tecnologias estão sendo continuamente avaliadas para mitigar o potencial de poluição da vinhaça, tais como: recuperação do efluente por vias microbianas; uso de enzimas microbianas no processo de descoloração da vinhaça; uso alternativo de vinhaça bruta como substrato para a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, como bioemulsificantes, entre outras (COLIN et al., 2016; ORTEGÓN et al., 2016; PANT e ADHOLEYA, 2007).

A fermentação escura da vinhaça de cana-de-açúcar, sozinha ou associada a uma etapa metanogênica, é uma alternativa promissora para mitigar os potenciais impactos ambientais e pode ser vantajosa para a recuperação de diferentes subprodutos de interesse sem interferir na sua qualidade como biofertilizante (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). A valorização deste efluente está totalmente alinhada ao conceito de biorrefinaria que visa aumentar a eficiência da recuperação de energia na gestão de resíduos (FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019). A vinhaça pode ser considerada como substrato para a produção de biohidrogênio (bioH_2) na etapa acidogênica devido ao seu conteúdo orgânico. Vários estudos mostram a viabilidade da fermentação escura da vinhaça para a produção de bioH_2 (ALBANEZ et al., 2016; 2018; COUTO et al., 2020; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE e ZAIAT, 2015a; 2015b; FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; FUESS et al., 2016; 2017a; 2018; FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019; LAZARO et al., 2014; MAGRINI et al., 2020; NIZ et al., 2019; REIS et al., 2015; SYDNEY et al., 2018) e a separação dos estágios também pode ser vantajosa para a obtenção de maior estabilidade no processo, maiores rendimentos de H_2 e viabilidade econômica para plantas em escala real (FUESS et al., 2017b).

Fuess et al. (2017b) investigaram diferentes projetos de plantas de digestão anaeróbia (DA) aplicadas à vinhaça em destilarias de grande porte, considerando esquemas de estágio único e duplo e diferentes estratégias alcalinizantes. Os autores obtiveram custos de investimento, de operação, de produção de biogás e eletricidade para cada caso e os resultados indicaram que a separação de fases é economicamente viável ao escalar plantas de DA em biorrefinarias. Apesar dos maiores custos de capital e operação nesses esquemas, os custos estimados de produção de biogás e eletricidade atingiram valores equivalentes ou inferiores aos de *layouts* de estágio único de DA, dependendo da estratégia de alcalinização utilizada. Em relação à estratégia de alcalinização, os melhores resultados foram associados à dosagem de hidróxido de sódio e/ou recirculação de efluentes. Os custos de eletricidade associados à dosagem e/ou recirculação de NaOH foram de 1,8-2,3 vezes menores em comparação com

custos de eletricidade da rede. Em contraste, o uso competitivo de bicarbonato de sódio em plantas de DA para o tratamento de vinhaça requer uma maior otimização da dosagem.

No estudo conduzido por Fuess et al. (2017a) foram comparados dois sistemas acidogênico-metanogênicos termofílicos combinados formados por um único reator acidogênico de leito empacotado seguido por dois reatores metanogênicos operados em paralelo, um reator UASB convencional e um reator anaeróbio de leito estruturado de fluxo ascendente. Considerando a operação do estágio acidogênico em condições estáveis, foram atingidos valores respectivos de produção volumétrica (PVH) e rendimento (HY) de H_2 de $1203 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $3,4 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ carboidratos totais (CH), que são consideravelmente superiores aos valores médios obtidos em estudos também baseados na fermentação anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em condições termofílicas: $1,4 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ CH (HY) e $527 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (PVH) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014); $1,6 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ CH (HY) e $762 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (PVH) (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a). Alterações no pH foram verificadas como consequência do acúmulo de ácidos orgânicos (AO), com valor médio de $5,1 \pm 0,2$ antes da adição de bicarbonato de sódio. Os autores relatam o fornecimento de alcalinidade com adição de bicarbonato como um fator chave na obtenção de desempenho estável, compensando as limitações de tempos de detenção hidráulica (TDHs) relativamente baixos (<24 h).

Ferraz Júnior; Etchebehere; Zaiat (2015a) estudaram a influência de uma alta carga orgânica volumétrica (COV) ($84,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) (DQO, demanda química de oxigênio) na produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito empacotado de fluxo ascendente, tratando vinhaça de cana-de-açúcar bruta em condição termofílica (55°C). Os valores máximos de PVH e HY foram $5252,6 \text{ mL } H_2 \text{ d}^{-1}$ e $3,7 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ CH, respectivamente. A comunidade microbiana também foi estudada e organismos pertencentes aos gêneros *Caloramator*, *Clostridium*, *Megasphaera*, *Oxobacter*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermohydrogenium* foram detectados em amostras retiradas do reator nos dias 30 e 60 de operação, sugerindo que esses organismos contribuíram para a produção de hidrogênio.

Sydney et al. (2018) utilizaram três consórcios anaeróbios mesófilos para produção de bioH_2 e AO em meio à base de vinhaça por meio de fermentação escura. Os consórcios LPBAH1 e LPBAH2 eram compostos predominantemente por *Oxalobacteraceae* e *Lactobacillaceae*, enquanto LPBAH3 era rico em *Lactobacillaceae* esporulantes (> 96%). Cada consórcio apresentou especificidades relacionadas à produção de biohidrogênio e AO: (i) o maior rendimento de bioH_2 foi obtido com LPBAH1 (>50% *Oxalobacteraceae*) em meio de

vinhaça suplementado com caldo de cana-de-açúcar ($1,59 \pm 0,21 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose); (ii) os menores rendimentos de H_2 foram alcançados com LPBAH3, que de outra forma produzia a maior quantidade de ácido butírico (até 10 g L^{-1}); (iii) LPBAH2 apresentou grande estabilidade na produção de H_2 em diferentes condições de pressão parcial de H_2 . A utilização de consórcios microbianos e efluentes industriais para a produção de biohidrogênio por fermentação escura é vista como uma estratégia chave na tentativa de superar as desvantagens econômicas e técnicas dessa potencial tecnologia.

Magrini et al. (2020) afirmam que é necessário o uso de consórcios microbianos com alta capacidade de produção de H_2 e AO. No entanto, não há consenso sobre o melhor pré-tratamento do inóculo para eliminar as bactérias consumidoras de hidrogênio. Desta forma, os autores avaliaram a influência de três métodos de pré-tratamento térmico do inóculo: T1 = $90^\circ\text{C}/10 \text{ min}$; T2 = $105^\circ\text{C}/120 \text{ min}$; T3 = $121^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ para a produção de H_2 e AO utilizando vinhaça como substrato. O efeito da concentração de vinhaça e do pH inicial (5,0, 6,0 e 7,0) também foram avaliados. Os maiores valores de produção de hidrogênio (821,34 mL) e rendimento ($4,75 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$) foram obtidos usando vinhaça não diluída em pH 6,0 e pré-tratamento T1. O maior número de cópias dos genes da Fe-hidrogenase confirmou a maior produção de H_2 . A presença de *Clostridium* e dos microrganismos anaeróbios facultativos *Bacillus* e *Enterobacter* nos consórcios microbianos foi confirmada por isolamento e PCR-DGGE. A maior produção de AO foi obtida em pH 7,0 e pré-tratamento T3. Este estudo mostrou que a fermentação escura pode ser conduzida pelo pré-tratamento do inóculo e pH selecionando diferentes processos para a produção de H_2 ou AO a partir da vinhaça in natura, sem adição de suplementos.

Fuess; Zaiat e Nascimento (2019) utilizaram um reator anaeróbio de leito estruturado na fermentação termofílica escura da vinhaça de cana-de-açúcar visando a produção de bio H_2 . O aumento da COV aplicada afetou positivamente a produção de bio H_2 , atingindo $2074 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e indicando uma carga ótima de aproximadamente $70 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. O controle do pH da fermentação (5,0–5,5) foi a principal estratégia para manter as condições produtoras de bio H_2 , compensando os impactos negativos associados à variabilidade composicional da vinhaça. Correlações metabólicas apontaram o lactato como substrato primário para a produção de bio H_2 , indicando seu acúmulo como evidência de reatores desequilibrados. A versatilidade do sistema acidogênico foi confirmada pela identificação de três vias metabólicas principais de acordo com o pH, ou seja, produtora de lactato (pH<5,0), produtora de bio H_2 /butirato (pH=5,0-

5,5) e produtora de bioH₂/reduzora de sulfato (pH>6,0), o que permite gerenciar a operação dos reatores para finalidades diversificadas em aspectos práticos.

Fuess et al. (2016) avaliaram a produção contínua de bioH₂ em um reator de leito empacotado operado em condições termofílicas (55°C) utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato. Os resultados indicaram que o reator acidogênico apresentou capacidade de recuperação de perdas de desempenho, independentemente de sua causa, e manutenção de taxas contínuas de produção de hidrogênio em operação de longo prazo (240 dias). O pH provou ser um fator chave para a obtenção de produção contínua de hidrogênio, e os resultados ótimos foram observados em uma faixa de pH de 5,1 a 5,2. Além disso, foi observada uma COV específica ótima de 6,3 e 6,4 g carboidratos g⁻¹ SSV d⁻¹, valor este consistente com os resultados de estudos anteriores focados na produção de hidrogênio a partir de sistemas fermentativos.

Reis et al. (2015) estudaram a produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em um reator anaeróbio de leito fluidizado e o ponto interessante deste estudo é que os autores utilizaram a glicose como fonte primária de carbono na primeira etapa e a vinhaça foi então adicionada gradativamente (0% a 100% da fonte orgânica). Duas concentrações de substrato foram utilizadas: R5 (5 g DQO L⁻¹) e R10 (10 g DQO L⁻¹) e o TDH foi variado em 6, 4, 2 e 1 h. A melhor PVH foi de 0,57 L h⁻¹ L⁻¹ (R5, TDH = 1 h, 100% vinhaça). O melhor HY foi de 3,07 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{adicionada} (R5, TDH = 6 h, vinhaça:glicose = 1:3). Os principais metabólitos foram etanol, ácido butírico, ácido propiônico e metanol. A análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante identificou *Prevotella sp.* e *Megasphaera sp.* pertencentes ao domínio Bacteria e *Methanobacterium sp.* e *Methanosphaera sp.* pertencente ao domínio Archaea.

Além da produção de bioH₂ por fermentação escura da vinhaça, Magrini et al. (2020) e Sydney et al. (2018) também relatam a produção de AO e solventes a partir deste efluente. Outros estudos também mostram o potencial de valorização da vinhaça por meio da produção de AO e solventes na etapa acidogênica (COUTO et al., 2020; NERY et al., 2018; ENG SÁNCHEZ et al., 2021; FUESS et al., 2018; FUESS et al., 2020; MORAES et al., 2019; SILVA et al., 2021; SYDNEY et al., 2014).

Eng Sánchez et al. (2021) investigaram o potencial do uso da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato na fermentação escura para recuperação de metabólitos solúveis com abordagem de biorrefinaria. Os impactos da temperatura (30–60 °C) e pH inicial (5,0–10,0) foram inicialmente avaliados em testes em batelada utilizando consórcios microbianos obtidos a partir da fermentação natural da vinhaça. O rendimento (401 mg DQO_{AO} g⁻¹ DQO_{inicial}) e a

produtividade ($653 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de AO foram maximizados em condições alcalinas/mesofílicas ($\text{pH} = 8,8\text{--}10,0$; 40°C). A fermentação do tipo acético prevaleceu a $30\text{--}40^\circ\text{C}$, enquanto o butirato foi o metabólito primário a uma temperatura mais alta (60°C). Outros experimentos baseados em alongamento de cadeia foram conduzidos pela adição de etanol e lactato como fontes de carbono exógenas na fermentação da vinhaça, também usando consórcios microbianos derivados da vinhaça como inóculo. O lactato foi adicionado como reagente químico e manipueira fermentada (fCFW). A adição de etanol foi irrelevante para a atividade acidogênica. Por outro lado, a adição de lactato aumentou diretamente a produção de ácidos propiônico, butírico, isovalérico e capróico, com predominância de butirato. O alongamento da cadeia foi particularmente favorecido ao adicionar fCFW com pH ajustado para 7,0, potencializando a geração de ácido capróico a partir de lactato e butirato e ácido isovalérico a partir de acetato e propionato. Tais resultados destacam o potencial de produção de AO a partir da vinhaça como alternativa aos combustíveis gasosos.

Fuess et al. (2020) investigaram a aplicação da fermentação escura para obtenção de metabólitos solúveis de valor agregado (PMS) da vinhaça como estratégia para aumentar a eficiência energética em biorrefinarias de cana-de-açúcar. Testes em batelada comparando sacarose e vinhaça como substratos foram conduzidos, fornecendo dados para entender as vias de conversão e medir as implicações energéticas da fermentação da vinhaça sob condições controladas. Dois métodos distintos de pré-tratamento do inóculo, ácido-térmico e térmico também foram avaliados. No geral, a produção do butirato foi a principal via de conversão observada na acidogênese da vinhaça, levando a concentrações de ácido butírico/isobutírico acima de $6,0 \text{ g L}^{-1}$, independentemente do pré-tratamento do inóculo. Os ácidos láctico e málico foram os substratos primários, com predominância da fermentação lactato-butirato, sugerindo o estabelecimento de uma relação sintrófica entre bactérias produtoras de lactato e populações de clostrídios. De acordo com os autores, considerando os aspectos energéticos, a produção aprimorada de butirato pode levar a um potencial de recuperação de energia de 30,9 a 33,4 MW, superando sistemas anaeróbios altamente eficientes de produção de biohidrogênio ($<1,0 \text{ MW}$) e metano (25,5 MW). Embora aspectos tecnológicos importantes ainda exijam a devida atenção para a recuperação de PMS de substratos fermentados de forma econômica, foi comprovada a relevância energética da produção de butirato a partir da vinhaça, caracterizando uma abordagem eficiente para melhorar o desempenho energético de biorrefinarias de cana-de-açúcar.

Moraes et al. (2019) avaliaram o papel da vinhaça de cana-de-açúcar como fonte de nutrientes e os impactos de diferentes métodos de pré-tratamento de inóculo (ácido-térmico e tratamento térmico) em sistemas acidogênicos visando a produção de AO de cadeia curta e álcoois de valor agregado. A produção de AO de cadeia curta foi 47,3% maior em reatores alimentados com vinhaça, com ácidos isobutírico (até 10,3 g L⁻¹) e butírico (até 10,6 g L⁻¹) como os metabólitos primários provavelmente resultantes da conversão de lactato. O etanol foi o principal produto das vias solventeogênicas em todas as condições, com valores variando entre 2,7 e 5,2 g L⁻¹, enquanto nenhum butanol foi detectado. As análises microbianas revelaram altos valores de abundância relativa para os gêneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Ruminococcus*, com predominância do gênero *Clostridium* (17%) em reatores de tratamento ácido-térmico e do gênero *Lactobacillus* (37%) em reatores de tratamento térmico. No geral, a vinhaça provou ser um substrato adequado para a produção de AO de cadeia curta de valor agregado, o que caracteriza uma abordagem potencial de gestão para esse fluxo de efluentes. Nesse sentido, a produção bioquímica de butirato a partir da vinhaça poderia diversificar o portfólio de produtos das biorrefinarias de cana-de-açúcar, minimizando também as perdas de energia ao converter frações de carbono residual.

Silva et al. (2021) afirmam que, apesar do potencial uso da vinhaça de cana-de-açúcar para a produção de AO, há dois obstáculos a serem superados para a viabilização dessa produção em larga escala: (i) atividade metabólica descontrolada com persistência de arqueias metanogênica em processos biológicos e (ii) limitações na recuperação dos AO produzidos (ATASOY et al., 2018). Os efeitos de parâmetros operacionais na produção e composição de AO, como pH, TDH, temperatura e tipo de inóculo utilizando vinhaça têm sido intensamente estudados.

Os diversos estudos citados demonstram um caminho promissor para a recuperação de diferentes subprodutos de interesse a partir da fermentação escura da vinhaça de cana-de-açúcar. No entanto, ainda existe uma necessidade de otimização dos parâmetros operacionais desse processo. Vários estudos citaram a necessidade de pré-tratamento do inóculo para a inibição de microrganismos metanogênicos e suplementação dos reatores com alcalinidade para que sua estabilidade seja mantida. Embora a redução ou mesmo a eliminação da suplementação de alcalinidade na fermentação escura seja de importância econômica e ambiental, poucos estudos sobre o assunto são relatados na literatura. O controle do pH é relatado como essencial para conduzir a acidogênese para a produção de AO, solventes e hidrogênio, e a possibilidade de perder o controle das vias bioquímicas é um tanto quanto desafiadora. Diante disto, acredita-

se que a estratégia de fermentação escura sem ajuste de pH que foi utilizada por Mota et al. (2018) deve ser avaliada para a vinhaça de cana-de-açúcar. É importante destacar que os autores obtiveram produção satisfatória de bioH_2 em pH abaixo de 3,0 com a inoculação do reator dispensando o pré-tratamento do lodo anaeróbio, necessário para a eliminação dos microrganismos consumidores de hidrogênio.

6 PROCESSAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE ATUM EM CONSERVA EM REATORES ACIDOGÊNICOS.

No Brasil, a cadeia do atum é um setor que vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Após mais de 20 anos com balança no comércio externo deficitária, esta cadeia apresentou um pequeno superávit em 2020 e um significativo crescimento em 2021. Em 2021, este setor apresentou um superávit comercial de 17 milhões de dólares, e desconsiderando comparações com o ano de 2020 (atípico por causa da pandemia da Covid-19) e analisando 2019, o crescimento nas exportações foi de 17 %, enquanto as importações apresentaram queda de 41%. Até 2017, as exportações de atum em conserva estavam concentradas apenas na região Sul e nas indústrias de Santa Catarina, no entanto, a partir de 2018, a indústria do Ceará elevou o total brasileiro exportado em 2021 para 17,3 milhões de dólares, o que resultou em um expressivo crescimento de 91% sobre o ano de 2019 (SEAFOOD BRASIL, 2022).

Como resultado do processo produtivo utilizado na indústria de conservas de pescado, são gerados grandes volumes de águas residuárias, que contêm altas concentrações de sólidos, matéria orgânica, nitrogênio, além da alta salinidade. A salinidade é causada principalmente por uma alta concentração de NaCl que está fortemente relacionada à sazonalidade neste setor, gerando cargas repentinas de choque de sal ou variações inesperadas na concentração de sal (2-35 g NaCl L⁻¹) (CRISTÓVÃO et al., 2016) dependendo das mudanças na matéria-prima processada na fábrica.

A Espanha é o maior produtor europeu de alimentos enlatados, com mais de 343.000 toneladas de produto produzido, avaliado em 1.500 milhões de euros. O produto principal, o atum, constitui cerca de dois terços do volume produzido e metade do valor. Notavelmente, a Espanha produz quase 70% das conservas de atum processado na UE (União Europeia) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2021).

A indústria de conservas de frutos do mar é um setor econômico crucial na Galícia (local onde foi realizada esta etapa da pesquisa, noroeste da Espanha), que representa 86% da produção total de conservas de peixes na Espanha. A Galícia é o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas da Tailândia e da China, e a sua produção representa atualmente 67% e 80% da produção europeia e espanhola, respectivamente. As conservas galegas produzem uma grande variedade de matérias-primas, e as conservas de atum representam 65,5% da produção total (BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES e VEIGA, 2017). Proteínas e lipídios são

predominantes nos efluentes do cozimento do atum. Portanto, é previsível um aumento na concentração de amônia quando se trata desse tipo de efluente, principalmente os efluentes de farinha de peixe, devido ao alto teor proteico (OMIL; MÉNDEZ e LEMA, 1996). Veiga; Méndez e Lema (1994) avaliaram o tratamento anaeróbio do processo de cozimento de atum e os autores também relataram que este efluente é caracterizado por uma alta concentração de proteínas, constituindo mais de 80% da matéria orgânica, o restante sendo ácidos orgânicos (AO) e gorduras, além de uma concentração relativamente alta de sal (9,2 g NaCl L⁻¹).

Esses efluentes precisam ser tratados de forma eficiente antes de seu lançamento para evitar pressões no meio marinho, e do ponto de vista da economia circular, a valorização desses efluentes é altamente desejada. Em 2020, a União Europeia (UE) adotou um novo plano de ação de economia circular que visa promover uma Europa mais limpa e competitiva por meio de medidas ao longo de todo o ciclo de vida do produto (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Visando esse novo conceito de economia circular, a recuperação de resíduos passa a ser um aspecto essencial e a digestão anaeróbia (DA) tem sido uma das estratégias mais utilizadas para a produção de produtos biotecnológicos de valor agregado. Uma metodologia de produção de base biológica eficiente deve levar em consideração todos os fatores que determinam a viabilidade do processo, como a necessidade de pré-tratamento, rendimento de produção, processos subsequentes de purificação e recuperação e, principalmente, disponibilidade da matéria-prima (BHATIA; YANG, 2017). Portanto, a utilização de resíduos como matéria-prima é essencial para a viabilização da produção biológica a partir da DA e diversos estudos mostram o potencial de recuperação de produtos (biogás, AO e solventes) a partir de resíduos e efluentes da indústria de produtos marinhos (BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES; VEIGA, 2017; CADAVID-RODRÍGUEZ; VARGAS-MUÑOZ; PLÁCIDO, 2019; FRA-VÁZQUEZ et al., 2020; OMIL; MÉNDEZ; LEMA, 1996; SÁNCHEZ, 2017).

Cadauid-Rodríguez; Vargas-Muñoz e Plácido (2019) avaliaram o potencial de produção de biogás a partir de dejetos de peixes como fonte de energia renovável para comunidades de pescadores. Quatro diferentes concentrações de resíduos de peixes (1%, 1,5%, 2% e 2,5% de sólidos totais (ST)) foram digeridos durante 28 dias em condições mesofílicas. A concentração de 1% de ST teve o maior PBM (464,5 mL CH₄ g SV⁻¹) e a menor produção de AO (2515 mg L⁻¹); em contraste, a concentração de 2,5% teve a maior produção de AO (11302 mg L⁻¹) e a menor produção de metano (206,86 mL CH₄ g SV⁻¹). Os resultados apresentados pelos autores mostraram que a produção de biogás a partir de dejetos de peixes é uma alternativa viável e

sustentável para o manejo adequado desse material e fornecer energia renovável às comunidades de pescadores.

Omil; Méndez e Lema (1996) avaliaram o tratamento individual ou em combinação dos principais efluentes produzidos na cocção de mexilhões ou atum e na fabricação de farinha de peixe em uma planta piloto industrial. Foi utilizado um digestor anaeróbio de atividade central de 15 m³, por um período de dois anos. Durante todo o período de operação, a eficiência de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) foi de 70 a 90% e a adição de nutrientes não foi necessária. Os percentuais de metano obtidos no biogás variaram entre 60 e 65% e o sulfeto de hidrogênio entre 1 e 4%, dependendo do teor de sulfato do afluente. A produção média de metano, medida a 15°C e 1 atm, foi de 301 L kg DQO_{removida}⁻¹.

Fra-Vázquez et al. (2020) avaliaram a eficiência de conversão de DQO em AO de um substrato composto por água residuária produzida em uma fábrica de processamento de mexilhões cozidos. Foi utilizado um reator de mistura de 5 L operado em modo contínuo. A acidificação máxima de 43% (AO total na base de DQO solúvel) foi obtida quando uma carga orgânica de $2,5 \pm 0,4$ g DQO L⁻¹ d⁻¹ foi aplicada ao reator, o que levou a uma produtividade volumétrica de AO de $0,72 \pm 0,07$ g DQO_{AO} L⁻¹ d⁻¹. Em estado estacionário, a mistura obtida de AO foi composta por 80: 18: 2% (AO com base na DQO solúvel) de ácidos acético: propiônico: butírico. Os carboidratos foram degradados em até 96%, enquanto a fermentação da proteína não ocorreu, provavelmente devido ao baixo valor do pH, limitando a acidificação máxima das águas residuárias. Experimentos em batelada mostraram que o aumento do pH de 4,2 para 4,9 pela adição de NaHCO₃ resultou na melhora da acidificação e alterou a composição da mistura de AO. A água residuária avaliada foi caracterizada com altas concentrações de matéria orgânica ($13,7 \pm 3,2$ g DQO L⁻¹) e sal ($21,8 \pm 2,8$ g NaCl L⁻¹) e baixo pH ($4,6 \pm 0,6$). Assim, este estudo demonstra a oportunidade de usar substratos complexos, como águas residuárias de processamento de mexilhões cozidos, para produzir afluentes ricos em AO em condições operacionais desfavoráveis, como alta salinidade e baixo pH.

Sánchez (2017) explorou a viabilidade da produção de ácidos orgânicos usando tipos distintos de águas residuárias de peixe enlatado em dois reatores acidogênicos. Uma das águas residuárias era proveniente da lavagem das caldeiras e a outra era produzida após a fervura do atum. A principal diferença entre elas reside no fato de o efluente de lavagem apresentar menores concentrações de matéria orgânica (4,16 e 16,3 de DQO solúvel, respectivamente) e de AO (0,26 e 9,27 g DQO_{AO} L⁻¹, respectivamente) em comparação com a água residuária de cozimento. O ácido acético foi o mais produzido: 45,5% DQO_{AO} ao acidificar o efluente de

lavagem e 43,1% DQO_{AO} ao acidificar o efluente de cozimento, comparando o estado estacionário de ambos os reatores. No entanto, o ácido propiônico também foi profusamente produzido durante a acidificação do efluente de lavagem (27,7% DQO_{AO}) enquanto, por outro lado, o butírico foi favorecido durante a acidificação do efluente de cozimento (38,4% DQO_{AO}), provavelmente devido à alta salinidade ($22,4 \pm 4,3$ g NaCl L⁻¹). Tal estudo demonstra novamente a viabilidade de acidificação de substratos muito complexos, como os de peixe enlatado, que são ricos em lipídios e proteínas com a dificuldade adicional das altas concentrações de NaCl.

Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) estudaram o efeito de vários valores de pH (5,0-10,0) e porcentagem de sólidos totais (ST) na digestão anaeróbia de resíduos de atum na produção de AO, tanto em ensaios em batelada quanto em reator contínuo. A produção de AO foi afetada pelo pH e foi significativamente maior em condições alcalinas atingindo uma produção de 30611 mg DQO L⁻¹ em pH 8,0. Os principais AO consistiram principalmente em ácido acético, propiônico, n-butírico e i-valérico. O ácido acético foi o principal produto em todos os valores de pH testados. Os melhores resultados foram obtidos com 2,5% de ST, atingindo 0,73 g DQO_{AO} g⁻¹ DQO_{resíduo}. Em concentrações mais altas de ST (5 e 8%), rendimentos mais baixos foram alcançados, provavelmente devido à inibição em altas concentrações de AO.

Mais atenção tem sido dada à valorização dos resíduos orgânicos na produção de ácidos orgânicos e solventes (BEVILACQUA et al., 2020; IGLESIAS-IGLESIAS et al., 2020). No entanto, o potencial de desenvolvimento industrial desses bioprocessos ainda é severamente limitado, principalmente devido à falta de seletividade do produto. A estequiometria de biotransformação depende fortemente de condições operacionais como pH ou características de alimentação e ainda não existem ferramentas que permitam que o processo seja completamente direcionado a esses produtos de interesse (REGUEIRA et al., 2019).

Apesar de serem uma fração relevante de muitos resíduos industriais, as proteínas e seus mecanismos de fermentação não foram estudados tão profundamente. Sua principal complexidade reside no fato de que podem ser considerados como uma mistura de cerca de 20 substratos diferentes, ou seja, os aminoácidos (AA). As reações de Stickland são amplamente aceitas como o principal mecanismo de conversão de AA em AO (RAMSAY e PULLAMMANAPPALLIL, 2001), no entanto, já foi demonstrado que sua estequiometria não é fixa. Existem evidências que sugerem que o pH pode afetar esse mecanismo (BEVILACQUA et al., 2020; 2021; BREURE e VAN ANDEL, 1984; REGUEIRA et al., 2019; YU; FANG,

2003). Mudanças em algumas condições operacionais modificam as rotas preferenciais de degradação de diferentes AA e conseqüentemente afetam o espectro do produto previsto. Também foi demonstrado que os AAs podem influenciar a degradação de outros devido à interação entre si. As reações de degradação de diferentes AA que tanto produzem quanto consomem NADH são um exemplo explícito dessa competição que pode ter diferentes produtos de degradação dependendo das condições operacionais ou das interações com outros AA.

Bevilacqua et al. (2020) investigaram como a composição proteica, ou seja, o perfil de AA, afeta o consumo individual dos mesmos e, conseqüentemente, o resultado do processo. Fermentações de cultura mista foram utilizadas com duas proteínas modelo (caseína e gelatina) usando reatores contínuos e em batelada com pH 7,0 a 25°C. A acidificação foi incompleta para ambas as proteínas, com a caseína atingindo um valor superior ao da gelatina. Embora dominados pelo ácido acético, os espectros do produto também foram diferentes, com o ácido n-butírico como o segundo produto principal para a caseína e o ácido propiônico para a gelatina. Foi demonstrado o consumo preferencial de AA, o que curiosamente depende da composição da proteína. A estequiometria descreveu com precisão a produção de ácido iso e n-butírico, mas falhou para a geração de ácido propiônico, iso e n-valérico. No geral, este estudo oferece uma melhor compreensão dos mecanismos de fermentação de proteínas, o que ajudará a melhorar os modelos de degradação e a projetar processos de fermentação, com base na seleção de substrato ideal.

Em um estudo posterior, Bevilacqua et al. (2021) investigou a influência do pH na conversão das proteínas modelo (caseína e gelatina) em AO pela fermentação de cultura mista anaeróbia. Neste estudo, foi demonstrado que o pH afeta a estequiometria da conversão de AA em AO, alterando as interações dos AA e/ou a configuração molecular. O pH 7,0 maximizou a degradação de AA, enquanto um espectro de produto mais diversificado foi obtido em condições ácidas (pH 5,0), independentemente da composição da proteína. No entanto, essas tendências foram mais evidentes na fermentação da caseína. Os autores também observaram que o pH 9,0 resultou em uma forte queda na conversão da gelatina, de valores próximos a 50% em pH 7,0 para valores abaixo de 20%. Concluiu-se que o resultado da fermentação de substratos ricos em proteínas depende principalmente da composição da proteína e do pH.

Regueira et al. (2019) estudaram a modelagem metabólica para prever a produção de AO a partir de substratos ricos em proteínas por fermentação de cultura mista. De acordo com os autores, os rendimentos de AO são afetados apenas pelo pH na região ácida com conversão máxima de proteínas em valor de pH 7,0, variando de 85% a 94%. Os autores também relatam

que o rendimento de n-butirato pode triplicar quando o pH muda de 6,0 a 4,5. Liang e Wan (2015) também relataram um aumento de 152% na produção de ácido butírico a partir de bagaço de malte de cevada, por meio da suplementação alternativa de ácido láctico.

Breure e Van Andel (1984) conduziram estudos de digestão anaeróbia de proteínas usando gelatina dissolvida em um meio mineral, em reatores contínuos de mistura com população mista de bactérias, alimentados com limitação de carbono. O TDH e o valor do pH da cultura foram variados progressivamente para determinar as condições ideais para hidrólise e acidificação (isto é, formação de AO). O valor ótimo de pH pareceu estar na região neutra ($\text{pH} > 6,3$), e o TDH mínimo que permitiu o crescimento em estado estacionário foi de 4,3 h. Sob este TDH e com pH igual a 7,0, a hidrólise da gelatina foi 78% completa e 79% da proteína hidrolisada foi fermentada para produtos identificáveis. Os principais produtos da fermentação foram acetato, propionato e valerato, e pequenas quantidades de outros AO. A composição do produto foi relativamente independente da taxa de diluição, mas variou substancialmente com o valor do pH.

Yu e Fang (2003) estudaram a influência do pH e da temperatura na acidogênese de águas residuárias ricas em gelatina em um reator anaeróbio de fluxo ascendente. Comparado com a temperatura, o pH teve um efeito mais significativo na acidogênese. A eficiência de degradação da gelatina aumentou substancialmente com o pH, de 60,0% em pH 4,0 a 97,5% em pH 7,0. O grau de acidificação aumentou de 32,0% em pH 4,0 para 71,6% em pH 6,5, mas caiu para 66,8% quando o pH aumentou para 7,0. O pH ótimo para a atividade acidogênica global foi de 6,0. A operação em pH de 4,0-5,0 favoreceu a produção de propionato, hidrogênio, enquanto a operação em pH 6,0-7,0 favoreceu a produção de acetato, butirato e iso-butirato.

Tais estudos demonstram uma recente busca por um melhor entendimento da produção de AO a partir da degradação de proteínas em processos de fermentação utilizando culturas mistas de microrganismos. Avanços no conhecimento de como a composição de AA de substratos proteicos afeta seu consumo e interação e, conseqüentemente, a seletividade dos AO e a produtividade do processo foram obtidos. No entanto, a maioria dos estudos da conversão de proteínas a AO atualmente disponíveis na literatura foram conduzidos com substratos sintéticos. Portanto, ainda falta entendimento e aplicabilidade em relação a efluentes reais. Este estudo visa ajudar a suprir essa lacuna atual na comunidade científica e, para tanto, avaliou a produção de AO a partir da fermentação escura de uma água residuária real rica em proteínas (efluente de cozimento de atum em conserva).

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Após toda esta fundamentação teórica, que descreve o processo de digestão anaeróbia e a possibilidade de recuperação de subprodutos de interesse a partir da fermentação escura de efluentes reais, os principais desafios de tais processos e a importância da valorização dos efluentes escolhidos para este estudo, a próxima parte deste trabalho se destina a aplicação destes conceitos aqui apresentados. Serão apresentados três estudos de fermentação acidogênica. No primeiro estudo, o soro de queijo foi utilizado como substrato principal e no segundo estudo a vinhaça de cana-de-açúcar foi o substrato escolhido. Ambos os estudos tinham como objetivo principal a produção de bioH_2 sem a utilização de qualquer tipo de controle de pH, além da produção de AO e solventes. O terceiro estudo que será apresentado, foi conduzido com o objetivo principal de compreender melhor os mecanismos de produção de AO e foi desenvolvido em parceria com o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Santiago de Compostela (USC). Este grupo possui vasta experiência na área de produção de compostos bioquímicos e de valor agregado e trabalha atualmente em uma linha de pesquisa específica na área de produção de ácidos graxos voláteis (AGV) a partir de águas residuárias.

Parte III - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

8 ETAPAS DO ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido com base no trabalho conduzido por Mota (2019) e o ponto de partida para escolha da configuração dos reatores utilizados e condições operacionais iniciais estabelecidas foram os melhores resultados obtidos pela autora. Mota (2019) avaliou a produção biológica de hidrogênio em longo prazo em reatores acidogênicos com efluente à base de sacarose em condições extremamente ácidas. A autora não utilizou nenhum tipo de ajuste de pH, o que resultou em valores em torno de 2,7 para o efluente. Uma produção de H₂ contínua, estável e de longa duração foi atingida, com valores de PVH de 4200 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e rendimento de 3,4 mol H₂ mol⁻¹sacarose_{consumida}, concomitante com a produção de ácido acético e etanol. Tais resultados abriram um novo campo de investigação para produção biológica de hidrogênio por fermentação escura sem ajuste de pH, além da necessidade de avaliação de tal estratégia de operação com diversos tipos de efluentes reais.

Este estudo (Processo FAPESP nº 2017/06940-6) também é parte integrante do Projeto Temático “Aplicação do conceito de biorrefinaria a estações de tratamento biológico de águas residuárias: o controle da poluição ambiental aliado à recuperação de matéria e energia” (Processo FAPESP nº 2015/06246-7) e foi dividido em três principais etapas conforme detalhado na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais etapas do estudo.

Etapa	Principal substrato utilizado	Configuração do reator	Temperatura	Produtos de interesse	Ajuste de pH
1	Soro de queijo desidratado reconstituído	UASB	35°C	BioH ₂ , ácidos orgânicos e solventes	Não
		LE	35°C		
2	Vinhaça de cana-de-açúcar <i>in natura</i> diluída	UASB	30°C	BioH ₂ , ácidos orgânicos e solventes	Não
		UASB	55°C		
3	Água residuária de cozimento de atum em conserva	Reator de mistura	37°C	Ácidos orgânicos e solventes	Sim

Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: LE - leito fixo estruturado; UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente).

A operação dos reatores das Etapas 1 e 2 foi realizada no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado na Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP) em São Carlos-SP, Brasil. As análises microbiológicas realizadas para estas etapas foram feitas em parceria com a pós-doutoranda Vera Tainá Franco Vidal Mota da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas

Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), supervisionada pela Dra. Valéria Maia Merzel. Também foi estabelecida uma parceria com o Dr. Gustavo César Dacanal, docente na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP de Pirassununga-SP, Brasil, onde foram realizadas análises que determinaram a distribuição do tamanho de partícula e diâmetro principal dos grânulos da biomassa dos reatores operados nas Etapas 1 e 2.

A Etapa 3 do estudo foi conduzida com base nos resultados obtidos na Etapa 1 e 2, nas quais foram obtidas altas concentrações de ácidos orgânicos (AO) e solventes, e foi realizada dentro do programa de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo FAPESP nº 2019/25341-1) em parceria com o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Santiago de Compostela (USC), Espanha sob a supervisão do Dr. Juan M. Lema.

Parte IV - ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO ACIDOGÊNICA

9 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DO SORO DE QUEIJO¹

Este estudo teve como objetivos específicos (i) avaliar a produção de biohidrogênio (bioH_2) a partir do soro de queijo, um efluente real e complexo, com baixa capacidade tampão, sem nenhum tipo de ajuste de pH; (ii) avaliar a produção de outros metabólitos de interesse, como ácidos orgânicos (AO); (iii) comparar o desempenho operacional de um reator UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) com um reator de leito fixo estruturado (LE) na fermentação escura do soro de queijo; e (vi) fornecer conhecimento para a compreensão da fermentação escura do soro de queijo sem ajuste de pH com e sem o uso de sacarose durante a partida do reator. A estratégia de fermentação escura sem ajuste de pH utilizada neste estudo pode diminuir os custos de bioconversão de resíduos em produtos biotecnológicos de valor agregado de interesse. Outra vantagem é que torna a prevenção da poluição mais atrativa economicamente, além de promover o avanço do conhecimento na área de valorização de efluentes.

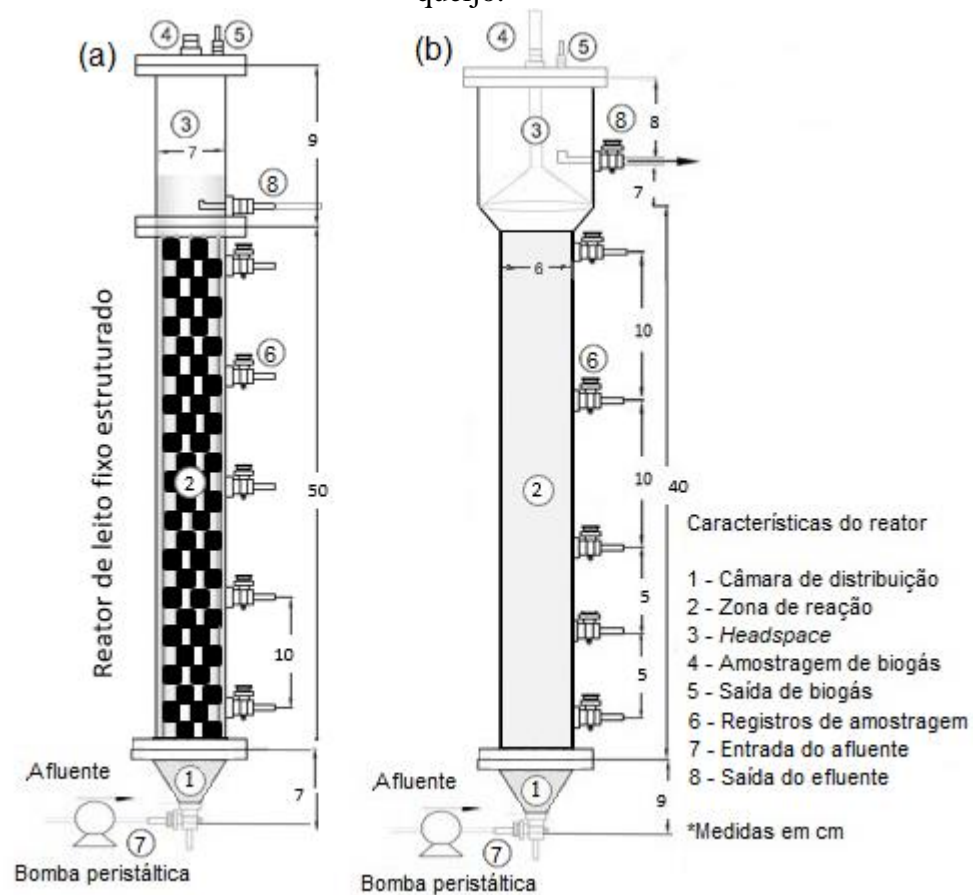
9.1 Material e métodos

9.1.1 Abordagem experimental e condições operacionais

As condições operacionais e configurações iniciais dos reatores em todas as etapas foram estabelecidas com base nos melhores resultados obtidos por Mota et al. (2018) para uma produção de bioH_2 de longo prazo com rendimentos satisfatórios, que foram $25 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (DQO, demanda química de oxigênio) para carga orgânica volumétrica (COV) e 4,6 h para o tempo de detenção hidráulica (TDH). Duas configurações de reatores acidogênicos foram avaliadas: um leito estruturado (LE) e um UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente) (Figura 4), que apresentaram a maior estabilidade e a maior produção de bioH_2 e rendimentos no estudo conduzido por Mota et al. (2018). Os reatores LE e UASB tinham um volume de 1,32 e 1,46 L, respectivamente, e ambos foram operados em condição mesofílica, 35°C .

¹Esta etapa do trabalho encontra-se presente no artigo Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of cheese whey without buffers under a mesophilic condition (RIBEIRO et al., 2022).

Figura 4 – Reator de leito estruturado (LE) (a) e reator UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente) (b) utilizado no processamento do soro de queijo.



Fonte: Elaborada pela autora.

O estudo foi dividido em três etapas que foram conduzidas de acordo com o substrato utilizado e o método de adaptação de biomassa e são resumidas na Tabela 3. A inoculação foi feita seguindo exatamente o procedimento descrito por Mota et al. (2018). Foi utilizado lodo granular de um reator UASB metanogênico (estágio único) que trata efluente de abatedouro de aves, localizado no município de Pereiras-SP. Os grânulos de biomassa foram completamente rompidos com um liquidificador, misturados ao substrato constituído de sacarose em proporção adequada para manter a concentração de 15 g SVT L^{-1} (SVT, sólidos voláteis totais) e o inóculo foi recirculado nos reatores por 3 dias com o mesmo TDH de operação dos reatores, 4,6 h. Em cada etapa, os reatores foram esvaziados e reinoculados utilizando o mesmo inóculo e procedimentos.

Tabela 3 - Resumo das etapas e suas condições operacionais para processamento de soro de queijo.

Etapa	Duração (d)	Substrato	Reatores	Nomenclaturas	COV (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	TDH (h)	S ₀ (g L ⁻¹)
1 - S	60	Apenas sacarose	UASB LE	U-S LE-S	25	4,6	4,45
2 - So	156	Apenas soro	UASB LE	U-So LE-So	25-90	4,6-48	4,8-60
3 - S (adaptação) + So (operação)	116	Início - sacarose Fim - soro	UASB LE	U-So (S) LE-So (S)	25	4,6	4,8

Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: U - UASB; LE - leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – S (adaptação) e So (operação).

Primeiramente, foi realizada uma etapa como controle (Etapa 1 - S). Os reatores foram alimentados com água residuária a base de sacarose, o mesmo substrato utilizado por Mota et al. (2018) composto por 4450 mg L⁻¹ de açúcar demerara (Native®) e uma solução de nutrientes proposta por Jeison (2007), cujas concentrações são apresentadas na Tabela 4. A COV e o TDH foram mantidos em 25 g COD L⁻¹ d⁻¹ e 4,6 h, respectivamente.

Tabela 4 – Composição da solução de nutrientes.

Composto	Concentração
NH ₄ Cl (mg L ⁻¹)	170
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	8
KH ₂ PO ₄ (mg L ⁻¹)	37
MgSO ₄ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	9
FeCl ₃ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	2
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	2
MnCl ₂ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,5
CuCl ₂ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,03
ZnCl ₂ (mg L ⁻¹)	0,05
H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	0,05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,09
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,1
NiCl ₂ .6H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,05
EDTA (mg L ⁻¹)	1
HCl 36% (μL L ⁻¹)	1

Fonte: Elaborada pela autora.

A próxima etapa do experimento foi conduzida com apenas soro de queijo sintético como substrato de alimentação (Etapa 2 - So). Inicialmente, a concentração do substrato (S₀), COV e TDH foram estabelecidas com base nos melhores resultados relatados por Mota et al. (2018), os quais foram 4,8 g L⁻¹, 25 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e 4,6 h, respectivamente. A partir do 15º dia de operação, a COV foi dobrada e o TDH foi mantido constante, resultando em um aumento da COV de 25 para 50 g DQO L⁻¹ d⁻¹. A partir do 47º dia de operação, a S₀ foi fixada em 60 g L⁻¹,

considerando que o soro de queijo típico tem uma DQO média de 50-102 g L⁻¹ (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Uma vez que a S₀ foi fixada, o TDH foi gradualmente variado de 4,6 a 48 h, resultando em mudanças na COV de 30 a 90 g DQO L⁻¹ d⁻¹ (conforme indicado na Tabela 5).

Uma terceira etapa da operação foi conduzida, Etapa 3 - S (adaptação) + S₀ (operação), na qual uma abordagem ecobiotecnológica foi utilizada como estratégia alternativa para melhorar a produção de bioH₂. Esta abordagem é baseada no princípio da competição e seleção natural, fornecendo um estresse seletivo para um metabolismo desejado em um sistema de comunidade microbiana diverso, com base nas condições de operação do substrato usado em um biorreator (BANU et al., 2020). Os reatores foram alimentados por cerca de 2 meses apenas com água residuária a base de sacarose. Posteriormente, o soro de queijo passou a ser adicionado e misturado ao afluente gradativamente, em proporções de 10% a 100%. Como nesta etapa a fração de soro de queijo era variável, as condições operacionais foram mantidas constantes em 25 g DQO L⁻¹ d⁻¹ para a COV e 4,6 h para o TDH. Esta estratégia de utilizar água residuária a base de sacarose durante a partida sob tais condições foi adotada para promover a seleção de microrganismos produtores de hidrogênio adaptados a condições extremamente ácidas, conforme relatado anteriormente por Mota et al. (2018).

Nas Etapas 2 e 3, foi utilizado o soro de queijo desidratado reconstituído e a composição do substrato de acordo com as especificações do fabricante era (%): carboidrato (76,5), proteína (13,3), gordura total (1,0), sódio (1,1) e umidade (3,5). O valor energético era de 363 kcal/100g. A caracterização de macro e micronutrientes presentes originalmente na composição considerando uma solução de 10 g de DQO L⁻¹ era (mg L⁻¹): ferro (0,092), níquel (<0,008), cálcio (90), cobalto (0,005), cobre (0,033), fósforo (136), magnésio (8,86), manganês (0,013), nitrogênio amoniacal (3), nitrogênio total (208), óleos e graxas (207), potássio (88), sódio (63), zinco (0,090) e carbono orgânico total (COT) (3728).

9.1.2 Monitoramento dos reatores e métodos analíticos

O monitoramento dos reatores baseou-se na medição das seguintes variáveis: pH, DQO total (DQOt) e solúvel (DQOs), carboidratos totais (CH), proteínas totais (Pr), ácidos orgânicos (AO), etanol (EtOH), metanol (MeOH), sólidos em suspensão voláteis (SSV) na fase líquida; vazão e composição do biogás (CB) para a fase gasosa. As análises de pH, DQOt, DQOs e SSV foram baseadas em protocolos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water*

and Wastewater (APHA; AWWA; WEF, 2012). As determinações de CH, ácido láctico (HLA) e Pr foram baseadas em Dubois et al. (1956), Taylor (1996) e Lowry et al. (1951) respectivamente. As concentrações de AO e solventes foram obtidas por cromatografia gasosa (GC/FID) segundo Adorno; Hirasawa e Varesche (2014). Antes das análises de DQOs, CH, HLA, AO e solventes, as amostras foram filtradas em filtros de 0,45 μm .

A CB (% de H_2 , CO_2 e CH_4) foi medida usando um cromatógrafo de gás (GC 2010 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna Carboxen (1010 plot, 30 m \times 0,53 mm) e um detector de condutividade térmica. O gás de arraste usado foi o argônio. A temperatura da coluna foi elevada de 130°C para 135°C a uma taxa de 46°C/min e as temperaturas do injetor e detector foram, respectivamente, 220 e 230°C (PERNA et al., 2013). A vazão de biogás foi monitorada por meio do acoplamento de um medidor de gás (modelo MGC-1 V30; Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GMBH & CO. KG, Bochum, Germany) diretamente no *headspace* dos reatores.

9.1.3 Avaliação de desempenho dos reatores

Com base nos resultados das análises de monitoramento, foram realizados cálculos para avaliar o desempenho dos reatores e os parâmetros incluíram: conversão de sacarose (EC_S ; %), conversão de carboidratos totais (EC_{CH} ; %); conversão de proteína (EC_{Pr} ; %); produção volumétrica de hidrogênio (PVH; $\text{mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$); CB (% de H_2 , CO_2 e CH_4), rendimento de hidrogênio (HY; $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$ (Etapa 1) e $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ CH}_{\text{consumidos}}$ (Etapas 2 e 3)), produção de ácido acético pela rota homoacetogênica ($[\text{HAc}]_{\text{homo}}$), rendimento de metabólitos (YM) e rendimento de ácido láctico (YHLA). As equações para calcular as variáveis de monitoramento são descritas na Eq. 1 a 9.

$$EC_X(\%) = \left(\frac{X_{af} - X_{ef}}{X_{af}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que X corresponde ao parâmetro analisado, X_{af} à sua concentração afluyente (g L^{-1}) e X_{ef} à sua concentração efluente (g L^{-1}).

$$VBG(\text{mL h}^{-1} \text{ e L d}^{-1}) = \left(\frac{Q_b \times Q_c}{t} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

Em que VBG corresponde à vazão de biogás, Q_b corresponde à vazão de biogás (mL e L), Q_c ao fator de calibração do gasômetro e t ao tempo de medida (h e d).

$$CB(\%) = \left(\frac{n_b}{n} \times 100 \right) \quad \text{Eq. 3}$$

Em que CB corresponde à % de biogás, n_b ao número de mols de cada um dos gases presentes no biogás: hidrogênio, metano e dióxido de carbono, e n ao número total de mols na amostra de gás injetado.

$$PVH(\text{mL } L^{-1} \text{ d}^{-1}) = \left(\frac{VBG (L \text{ d}^{-1}) \%H_2}{V_u} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

Em que V_u corresponde ao volume útil do reator (L) e PVH e apresentado nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

$$QMH [\text{mol}H_2 \text{ h}^{-1}] = \frac{P \cdot VBG (\text{mL } h^{-1})}{R \cdot T} \times n_{H_2} \quad \text{Eq. 5}$$

Em que, QMH corresponde à vazão molar de H_2 ($\text{mol } h^{-1}$), P corresponde à pressão, R à constante universal de gases perfeitos, T à temperatura e n_{H_2} ao número de mols de H_2 presentes no biogás.

$$HY(\text{mol } CH^{-1}_{consumido}) = \left(\frac{QMH}{Q_{af} \times (CH_{af} - CH_{ef})} \right) \times MM_{CH} \quad \text{Eq. 6}$$

Em que QMH corresponde à vazão molar de hidrogênio ($\text{mol } h^{-1}$), Q_{af} corresponde à vazão de afluente ao reator ($\text{mL } h^{-1}$), CH_{af} and CH_{ef} correspondem respectivamente à concentração de carboidratos totais ($\text{g } L^{-1}$) no afluente e efluente, MM_{CH} à massa molar de carboidratos totais ($\text{mol } g^{-1}$).

$$[HAc]_{homo} = (8[HAc] + 4[HBu] - [HPr] - [H_2])/12 \quad \text{Eq. 7}$$

Eq. 7 mostra como estimar o ácido acético pela rota homoacetogênica quando há apenas produção de H₂ e CO₂ a partir do acetato, i.e., sem metano. Todas as variáveis se referem à vazão molar do ácido orgânico correspondente ou H₂ em mol h⁻¹. É importante destacar que este modelo possui uma rota simplificada de produção de H₂, não incluindo, por exemplo, a rota do ácido láctico e do etanol (PENTEADO, 2012).

$$YM (\%) = \frac{\sum C_M}{DQO_{af}} \times 100 \quad \text{Eq. 8}$$

Em que C_M corresponde à concentração total de metabólitos medidos (g DQO L⁻¹) no efluente do reator e DQO_{af} à DQO total (g L⁻¹) no afluente.

$$YHLa (mgDQO HLa g^{-1} DQO_{af}) = \frac{HLa_{prod}}{COD_{af}} \quad \text{Eq. 9}$$

Em que HLa_{prod} corresponde ao HLa produzido (mgDQO HLa_{ef} L⁻¹ – mgDQO HLa_{af} L⁻¹) e DQO_{af} à DQO total (g L⁻¹) no afluente.

Os *softwares* Past® 4.0 e Statistica® 13 foram usados para realizar os testes estatísticos. O teste Shapiro-Wilk foi aplicado inicialmente para verificar a normalidade dos dados e o nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) foi adotado. Uma vez que a normalidade dos dados foi determinada, o teste t foi usado para os dados paramétricos e Mann-Whitney para os dados não paramétricos.

9.1.4 Análise da comunidade microbiana

Amostras de lodo foram retiradas dos reatores ao final da operação de cada etapa para análises de diversidade microbiana. As células foram separadas por centrifugação (4°C, 6000 g, 10 min), lavadas com tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS), centrifugadas novamente e mantidas a -20°C. O ácido desoxirribonucléico (DNA) total da comunidade foi extraído e purificado com o kit DNeasy PowerSoil (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA obtido foi avaliada em gel eletroforese a

1%, e a concentração de DNA foi medida usando o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da Unicamp, Campinas, Brasil. A biblioteca foi preparada de acordo com o *Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide*. O tamanho e a concentração do fragmento de DNA foram analisados usando Agilent 2100 Bioanalyzer. A região V3-V4 dos genes de rRNA 16S foi amplificada a partir do DNA da comunidade usando os iniciadores direto e reverso 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG e 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC, respectivamente, na reação de PCR. Os produtos da PCR foram carregados no Illumina MiSeq para sequenciamento de extremidades emparelhadas de 300 bp.

As análises de bioinformática foram realizadas no Qiime2 versão 2019.10 (BOLYEN et al., 2019) utilizando o fluxo de trabalho Dada2 (CALLAHAN et al., 2016) e o classificador de taxonomia baseado em sklearn (PEDREGOSA et al., 2011). Curvas de rarefação foram geradas para avaliar se o esforço amostral foi suficiente para cobrir a riqueza microbiana. O índice de Shannon, que considera a abundância e uniformidade da taxa como componentes da diversidade biológica, foi calculado como uma medida da diversidade alfa (diversidade dentro das amostras). A diversidade entre as amostras (diversidade beta) foi analisada usando o índice de Bray-Curtis. O banco de dados da região Silva 16S V3/V4 versão 132 foi usado para atribuição taxonômica (QUAST et al., 2013). Uma árvore filogenética foi reconstruída para as sequências mais abundantes encontradas nos reatores. Os vizinhos mais próximos, de acordo com Silva Alignment e busca BLASTn, foram adicionados à árvore. As sequências foram alinhadas usando Mafft (KURAKU et al., 2013) e a árvore foi reconstruída com base no método de *neighbour-joining* e modelo evolutivo Jukes-Cantor, com valores de inicialização calculados a partir de 1000 corridas replicadas (KURAKU et al., 2013). A extensão Archaeopteryx (HAN; ZMASEK, 2009) na versão online do programa Mafft foi utilizada para a visualização da árvore.

9.2 Resultados e discussões

9.2.1 Produção de bioH₂ e conversão de substrato

Na Etapa 1 (S), ambos os reatores não apresentaram diferença estatisticamente significativa (valor- $p = 0,856$) para os valores de PVH, com uma média de 1848 ± 1148 e $2096 \pm 1333 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para os reatores U-S e LE-S, respectivamente (Figura 5a), com valor médio de pH de 2,7 para ambos os reatores (Tabela 5). Apesar desses valores menores de PVH quando comparados a $4200 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, o qual foi apresentado por Mota et al. (2018) em um reator UASB alimentado com água residuária a base de sacarose sob a mesma COV e TDH, uma tendência de aumento da produção foi observada em ambos os reatores (Figura 5a). Valores de PVH próximos aos relatados por Mota et al. (2018) foram observados a partir do 51º dia de operação, quando vários problemas de operação foram solucionados e uma rotina otimizada foi estabelecida.

Os reatores U-S e LE-S apresentaram HY médio respectivo de $1,9 \pm 1,7$ e $2,0 \pm 1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$. Embora este estudo tenha apresentado um rendimento médio inferior ao relatado por Mota et al. (2018), o qual foi $3,4 \pm 0,7 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$ para um reator UASB sob a mesma COV e TDH, valores de HY máximo de 5,8 e $3,0 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$ foram obtidos para os reatores U-S e LE-S, respectivamente. O valor máximo obtido para o reator U-S neste estudo pode ser comparado ao valor máximo apresentado pelo reator UASB usado por Mota et al. (2018), que foi de aproximadamente $5 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$, indicando um potencial para melhores rendimentos se as condições operacionais ótimas do sistema fossem estabelecidas. Esses resultados foram obtidos em valores médios de pH de 2,7, confirmando que a produção contínua de bioH₂ em pH menor que 3,0 é possível e incentivando a próxima etapa de operação com soro de queijo, utilizando o mesmo inóculo sem pré-tratamento e sem ajuste de pH.

Na Etapa 2 (So), os valores médios de pH foram 3,6 (Tabela 5). A não adição de tampões nos reatores alimentados com soro de queijo não resultou em condições ácidas extremas como nos reatores alimentados com sacarose. Esses valores de pH mais altos permitiram o crescimento de uma microbiota mais diversa e não favoreceram os produtores de hidrogênio encontrados na Etapa 1 (S), conforme será melhor descrito na seção 9.2.3 Composição da comunidade microbiana. Apesar de várias estratégias operacionais utilizadas (variação de TDH de 4,6 a 48 h e COV de 25 a 90 g DQO L⁻¹ d⁻¹), ambos os reatores (U-So e LE-So) apresentaram produção praticamente nula de bioH₂ até o 131º dia de operação (Figura 5b e 5c), quando os reatores foram novamente submetidos às condições iniciais (TDH de 4,6 e COV de 25 g DQO L⁻¹ d⁻¹) e houve um aumento da PVH do reator LE-So para $31 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A partir deste momento, quando a COV foi dobrada para $50 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, no 141º dia, os melhores

resultados de PVH foram obtidos para ambos os reatores, principalmente para o reator U-So, que atingiu uma produção máxima de $2368 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. No entanto, essa produção durou alguns dias e foi acompanhada de uma queda que foi atribuída ao estabelecimento da homoacetogênese nos reatores U-So e LE-So, os quais apresentaram valores médios respectivos de $92,6 \pm 3,3$ e $93,1 \pm 3,3\%$ para $[\text{HAc}]_{\text{homo}}$. No entanto, resultados promissores em relação à produção de ácidos, principalmente ácido láctico, foram alcançados, conforme será melhor discutido na seção 9.2.2 Produção de ácidos orgânicos e solventes.

Tabela 5 – Valores médios de pH, conversão de sacarose (EC_S), carboidratos (EC_{CH}) e proteínas (EC_{Pr}), rendimento de H₂ (HY) e composição do biogás (CB) para processamento de soro de queijo.

Etapa 1 – sacarose										
Período ^{a*}	pH U-S	pH LE-S	HY U-S ^e	HY LE-S ^e	EC _S U-S ^d	EC _S LE-S ^d	HY U-S ^e	HY LE-S ^e	H ₂ /CH ₄ U-So ^d	H ₂ /CH ₄ LE-So ^d
1-60	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,1	1,9 ± 1,9	1,1 ± 0,7	58 ± 31	75 ± 19	1,9 ± 1,9	1,1 ± 0,7	52 ± 8/0	49 ± 11/0
Etapa 2 – soro de queijo										
Período ^a	1-14	15-25	26-46	47-63	64-79	80-95	96-115	11-131	132-141	142-156
Concentração^g	4.8	9.6	9.6	60	60	60	60	60	4.8	9.6
TDH^b	4.6	4.6	4.6	48	32	24	19,2	16	4.6	4.6
COV^c	25	50	25	30	45	60	75	90	25	50
pH U-So	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,0	3,8 ± 0,5	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2
pH LE-So	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,0	4,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,0	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2
EC _{CH} U-So ^d	53 ± 41	71 ± 13	69 ± 28	47 ± 26	8 ± 9	15 ± 9	9 ± 9	5 ± 8	49 ± 36	52 ± 28
EC _{CH} LE-So ^d	69 ± 34	79 ± 12	82 ± 20	49 ± 27	5 ± 3	11 ± 9	6 ± 8	11 ± 10	69 ± 20	40 ± 11
EC _{Pr} U-So ^d	13 ± 10	26 ± 10	30 ± 15	11 ± 23	0 ± 0	2 ± 5	7 ± 7	2 ± 5	0 ± 0	12 ± 11
EC _{Pr} LE-So ^d	18 ± 17	23 ± 2	38 ± 10	24 ± 36	0 ± 0	2 ± 3	8 ± 7	4 ± 5	0 ± 0	24 ± 18
HY U-So ^f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2 ± 0,3
HY LE-So ^f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6 ± 0,6
H ₂ /CH ₄ U-So ^d	0/0	12 ± 9/0	7 ± 11/11 ± 12	35 ± 17/0	3 ± 2/0	3 ± 2/0	43 ± 31/0	61 ± 10/0	41 ± 23/0	56 ± 30/0
H ₂ /CH ₄ LE-So ^d	5 ± 6/0	18 ± 8/0	3 ± 6/22 ± 12	5 ± 5/13 ± 7	16 ± 10/3 ± 1	40 ± 11/3 ± 2	58 ± 3/1 ± 3	60 ± 9/0	13 ± 13/0	53 ± 24/0
Etapa 3 – sacarose (adaptação) + soro (operação)										
Período ^{a*}	1-47	48-59	60-73	74-89	92-101	102-116				
Fração de sacarose/soro^d	100/0	90/10	70/30	50/50	25/75	0/100				
pH U-So (S)	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,8 ± 0,2				
pH LE-So (S)	2,8 ± 0,0	2,7 ± 0,0	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,3				
EC _{CH} U-So (S) ^d	76 ± 9	77 ± 10	67 ± 7	38 ± 8	42 ± 6	60 ± 14				
EC _{CH} LE-So (S) ^d	71 ± 12	80 ± 5	70 ± 9	53 ± 10	64 ± 3	80 ± 17				
EC _{Pr} U-So (S) ^d	0 ± 0	8 ± 14	9 ± 8	1 ± 1	2 ± 3	10 ± 7				
EC _{Pr} LE-So (S) ^d	0 ± 0	13 ± 22	10 ± 6	2 ± 3	1 ± 1	11 ± 9				
HY U-So (S) ^f	1,9 ± 0,9	2,3 ± 1,3	2,4 ± 0,8	1,6 ± 1,7	0,5 ± 0,6	0,5 ± 0,2				
HY LE-So (S) ^f	1,6 ± 1,1	1,2 ± 0,9	1,6 ± 0,4	1,4 ± 1,6	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,1				
H ₂ /CH ₄ U-So (S) ^d	64 ± 9/0	63 ± 9/0	58 ± 4/0	57 ± 22/0	65 ± 12/0	54 ± 12/0				
H ₂ /CH ₄ LE-So (S) ^d	37 ± 7/0	63 ± 3/0	59 ± 4/0	59 ± 19/0	59 ± 25//0	33 ± 16/0				

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: ^ad, ^bh, ^cg DQO L⁻¹ d⁻¹, ^d%, ^emol H₂ mol⁻¹ sacarose_{consumida}, ^fmol H₂ mol⁻¹ CH₄_{consumidos}, ^gg L⁻¹; *S₀ fixada em 4,45 (Etapa 1) e 4,8 (Etapa 3) g L⁻¹.

Siglas: U – reator UASB; LE – reator de leito fixo estruturado; S – sacarose; So – Soro de queijo; So (S) – S (adaptação) e So (operação).

Tabela 6 - Condições operacionais e desempenho na produção de hidrogênio de reatores anaeróbios aplicados no tratamento de soro.

Referência	Reator	Condições operacionais	Performance do sistema
Asunis et al. (2019)	Reator em batelada (1,8 L)	pH = 6,0 T = 39 ± 1 °C e TDH = 168 h COV = 32,06 ± 1,6 g COT L ⁻¹	PVH _{max} = 5200 mL H ₂ L ⁻¹ HY _{max} = 1,54 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose
Castelló et al. (2018)	Reator de mistura (3,6 L)	pH = 5,5 T = 30 °C e TDH = 24 h COV = 29 ± 4 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 800 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 0,9 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose _{consumida}
Davila-Vazquez et al. (2009)	Reator de mistura (0,31 L)	pH = 5,9 T = 37 °C e TDH = 6 h COV = 138,6 g lactose L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 25042 mL H ₂ L ⁻¹ d ^{-1b} HY _{max} = 2,8 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose
Marques et al. (2019)	Reator anaeróbio de leite fluidizado (1,2 L)	pH = 4,1 ± 0,3 T = ambiente (26-33 °C) e TDH = 6 h COV = 12,34 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	PVH _{max} = 960 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 2,73 mol H ₂ mol ⁻¹ carboidrato
Perna et al. (2013)	Reator anaeróbio contínuo de leite fixo de fluxo ascendente (2,5 L)	pH = 5,6 ± 0,2 T = 30 °C e TDH = 24 h COV = 37 ± 1 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 1000 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 1,1 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose
Ramos e Silva (2017)	EGSB (2,18 L)	pH = 4,0 – 4,3 T = 30 °C e TDH = 4 h COV = 210 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 7488 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 0,96 ± 0,1 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose
Ramos et al. (2019)	EGSB (0,78 L)	pH = 4,0 – 4,3 T = 30 °C e TDH = 0,25 h COV = 610 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 1951 ± 171 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 3,2 ± 3 mL H ₂ g ⁻¹ DQOap (mL de H ₂ por grama de DQO aplicada)
Etapa 3 de estudo ^a	Reator UASB (1,46 L)	pH = 3,4 – 4,0 T = 35°C e TDH = 4,6 h COV = 25 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	PVH _{max} = 1246 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 0,76 mol H ₂ mol ⁻¹ CH _{consumidos}
Etapa 3 de estudo ^a	Reator LE (1,32 L)		PVH _{max} = 355 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ HY _{max} = 0,30 mol H ₂ mol ⁻¹ CH _{consumidos}

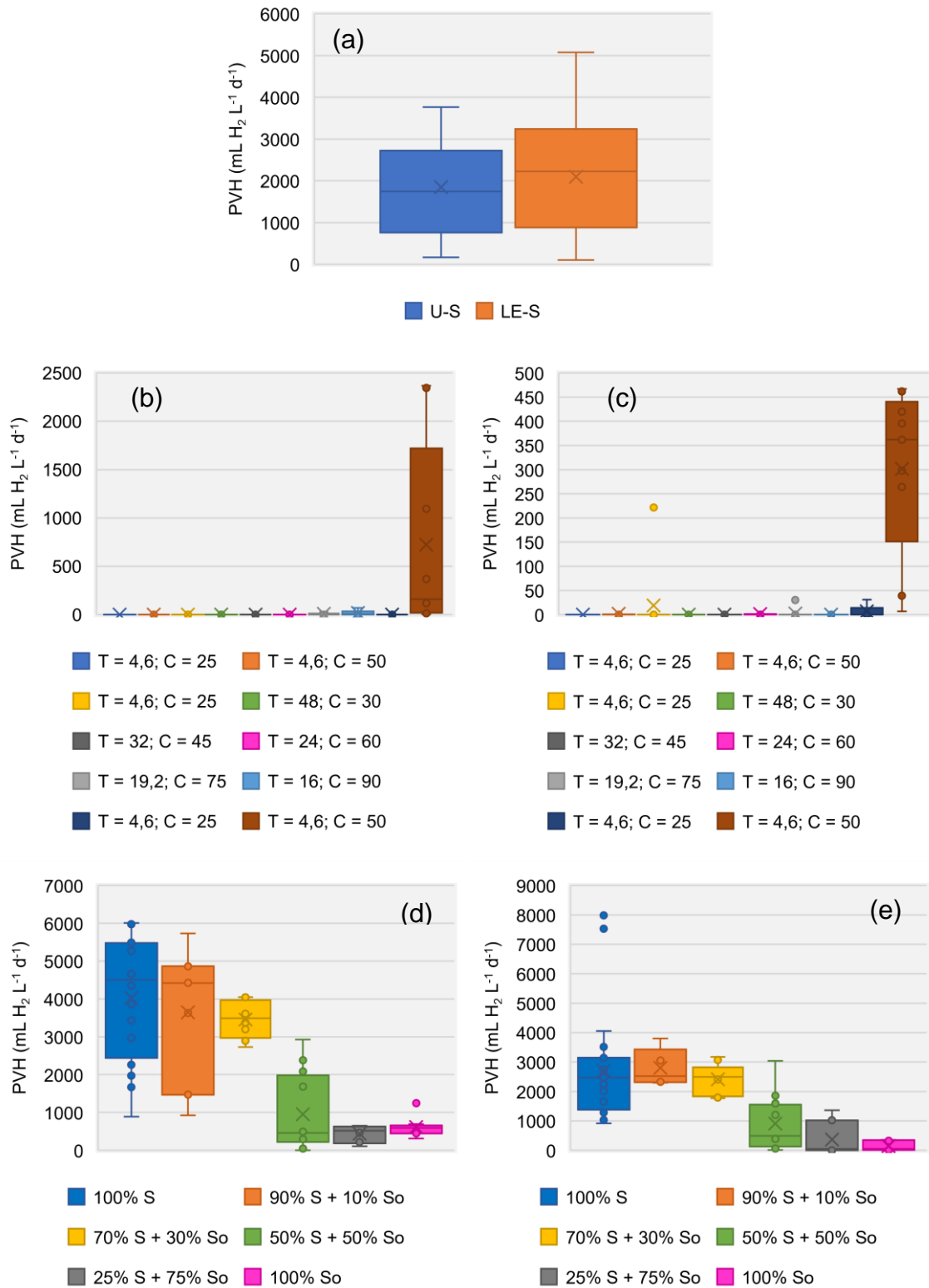
Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: ^aForam considerados apenas os dados referentes à última condição (100% soro de queijo), quando a sacarose foi totalmente retirada do substrato de alimentação do reator.

^bO valor foi corrigido para NTP quando convertido de mmol para mL.

Siglas: EGSB - *expanded granular sludge bed* (leite de lodo granular expandido), PVH_{max} - produção volumétrica máxima de hidrogênio, HY_{max} - rendimento máximo de hidrogênio.

Figura 5 - Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em cada condição na (a) Etapa 1 – U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So (S) e (e) LE-So (S) para processamento de soro de queijo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: U –UASB; LE - leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – S (adaptação) e So (operação); T – TDH (h); C - COV ($\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Vários estudos de produção anaeróbia de H₂ com soro de queijo relatam ocorrência significativa de homoacetogênese. Castelló et al. (2018) estimaram que até 57% da produção de ácido acético foi devido à rota homoacetogênica. Montecchio; Yuan e Malpei (2018) relataram que aproximadamente 90% do H₂ produzido por fermentação escura foi consumido pela homoacetogênese. A via homoacetogênica não é desejada em sistemas que visam a produção de H₂, pois a formação de acetato ocorre em organismos autotróficos autogênicos (homoacetogênicos) por meio da redução de CO₂ com H₂. Embora a homoacetogênese produza acetato, ela consome H₂ e CO₂ e um dos desafios a serem enfrentados é determinar em que condições ela se estabelece para que possa ser evitada (SAADY, 2013).

Uma vez que nenhuma produção relevante de H₂ foi obtida na Etapa 2 (So), quando apenas soro foi usado como substrato, uma terceira etapa de operação foi realizada, Etapa 3 - sacarose (adaptação) + So (operação), utilizando os mesmos reatores e inóculo das etapas anteriores. No entanto, uma estratégia de partida diferente foi adotada. Os reatores foram alimentados inicialmente apenas com água residuária a base de sacarose e o soro de queijo foi gradualmente introduzido até que a sacarose fosse eliminada.

Na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), o pH aumentou em ambos os reatores (Tabela 5) conforme a proporção de soro no afluente era aumentada, concomitante a uma queda na PVH (Figura 5d e 5e). Quando o soro era o único substrato, o pH ambiente estava em torno de 4,0, que é próximo ao valor de 3,8 obtido por Asunis et al. (2019) para fermentação escura de soro em condições de pH não controladas. De acordo com Sikora et al. (2013), o pH pode ser um fator crítico que afeta o crescimento bacteriano e as mudanças na acidez em biorreatores podem ser o resultado ou a razão do desequilíbrio entre os microrganismos que constituem as comunidades microbianas produtoras de hidrogênio.

Enquanto apenas a sacarose estava sendo usada como substrato na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), os reatores U-So (S) e LE-So (S) apresentaram valores médios de PVH respectivos de 4030 ± 1597 e 2699 ± 697 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e valores máximos de PVH respectivos de 6010 e 7980 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹. Esses valores são compatíveis com a PVH média relatada por Mota et al. (2018) (4200 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) que foi mencionada no início desta seção.

Entre o 79º e o 82º dia de operação da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)) houve um período de desequilíbrio nos reatores e alterações nas rotas metabólicas causadas pela tentativa de adicionar ácido clorídrico (HCl) ao afluente para que o pH da alimentação pudesse ser mantido abaixo de 3,0. Essa tentativa foi feita porque a mudança para uma concentração de 50% de soro no afluente foi um ponto crítico, pois foi exatamente neste período que houve um

aumento na proporção de soro e nos valores de pH (Tabela 5), os quais foram acompanhados por uma queda na PVH (Figura 5d e 3e), com diferenças estatisticamente significativas para os reatores U-So (S) (valor-p = 0,015) e LE-So (S) (valor-p = 0,041). Mota et al. (2018) relataram produção de H₂ sempre em condições de pH entre 2,5 e 3,0, o que também foi observado na Etapa 1 (S) e até o 73º dia de operação da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)).

A adição de HCl foi logo interrompida no 82º dia por se acreditar que tal estratégia teve um efeito extremamente negativo na produção de bioH₂, já que sua proporção em ambos os reatores atingiu valores próximos a zero, e logo que o HCl parou de ser adicionado, houve restabelecimento da produção. Essa estratégia também não se prolongou devido à preocupação com a microbiota dos reatores, a qual poderia ser irreversivelmente prejudicada, já que foram necessários quase dois meses de adaptação por meio da alimentação com apenas sacarose.

Houve diminuição significativa dos valores médios de PVH e HY observados na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), a partir do momento que a fração de soro de queijo e sacarose no substrato era 50%. No entanto, a produção de bioH₂ a partir da fermentação escura do soro de queijo tem se mostrado bastante desafiadora mesmo em estudos nos quais o pH foi controlado por meio da adição de tampões, uma vez que valores baixos de PVH e HY são relatados por diversos autores, como pode ser visto na Tabela 6. O maior rendimento máximo de H₂ (HY_{max}), 2,8 mol H₂ mol⁻¹ lactose relatado por Davila-Vazquez et al. (2009) foi obtido sob pH 5,9 e com uma COV de 138,6 g lactose L⁻¹ d⁻¹, ou seja, mais de 5 vezes maior que a COV aplicada à Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)) neste estudo. Apesar do baixo HY_{max} de 0,76 mol H₂ mol⁻¹CH_{consumidos} apresentado pelo U-So (S), que foi alimentado apenas com soro de queijo, a PVH_{max} foi de 1246 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹, que é maior que a PVH_{max} relatada em estudos conduzidos por Castelló et al. (2018); Perna et al. (2013) e Marques et al. (2019), que também utilizaram soro de queijo como substrato.

Um estudo recente sobre a produção de hidrogênio a partir do soro por meio de fermentação escura conduzido por Lovato et al. (2021) atingiu HY equivalente a 3,0 mol H₂ mol⁻¹ carboidratos, mas em condição termofílica, o que aumenta os custos do processo. Neste estudo, os valores médios de PVH e HY foram, respectivamente, 26 ± 11 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 0,5 ± 0,2 mol H₂ mol⁻¹ CH_{consumidos} para o U-So (S), e 6 ± 7 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹ e 0,2 ± 0,1 mol H₂ mol⁻¹ CH_{consumidos} para o LE-So (S) quando os reatores foram alimentados apenas com soro na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)). Embora a estratégia de adaptação de biomassa usada nesta etapa tenha resultado em maior produção de H₂ quando comparado à Etapa 1 (S), ela não foi

suficiente para permitir produção de bioH₂ estável e contínua (Figura 5d e 5e), conforme a proporção de soro de queijo no substrato de alimentação era aumentada.

No entanto, a estratégia de adaptação da biomassa foi eficaz para obter estabilidade nas concentrações de H₂ no biogás, uma vez que valores acima de 50% foram observados ao longo da operação até a fase de 100% de soro de queijo, principalmente no reator UASB (Tabela 5). Não foi observada concentração de CH₄ durante toda a operação da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), nem em níveis traço, indicando que a estratégia de adaptação com sacarose também foi eficiente para a inibição de microrganismos metanogênicos, que apresentaram atividade na Etapa 2 (So) (Tabela 5), apesar das estratégias adotadas, tal como o uso de uma alta COV e baixo TDH.

Melhores resultados médios de conversão de carboidratos foram obtidos na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), $64 \pm 19\%$ e $70 \pm 16\%$ para os reatores U-So (S) e LE-So (S), respectivamente, em comparação com a Etapa 2 (So), na qual os reatores U-So e LE-So mostraram conversão média de carboidratos respectivamente de $38 \pm 33\%$ e $41 \pm 35\%$. Uma queda na conversão de carboidratos na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), quando a fração de sacarose e soro no substrato era de 50%, não foi associada à sobrecarga do sistema, como ocorreu na Etapa 2 (So), quando o TDH era de 32 h e a COV $45 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabela 5). Tal queda pode ser associada a um período de adaptação dos microrganismos, já que ocorreu queda na conversão de carboidratos exatamente no ponto de modificação da alimentação para a nova fração de soro, seguida de um aumento gradual. Pode-se inferir que microrganismos que consomem H₂ prevaleceram, já que exatamente neste ponto houve diminuição estatisticamente significativa da PVH (valor-p de 0,015 para U-So (S) e valor-p de 0,041 para LE-So (S)). Isso ocorreu concomitantemente ao aumento do pH para valores acima de 3,0 (Tabela 5) e às alterações nos metabólitos observados, que são melhor descritas e discutidas na próxima seção.

Acredita-se que menores valores de HY obtidos na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), quando a sacarose foi eliminada do substrato, estejam relacionados ao aumento da concentração de proteínas que estão presentes no soro. De acordo com Cabrol et al. (2017), a etapa de hidrólise pode ser um importante fator limitante para a produção de H₂ na presença de proteína, pois sua degradação envolve reações que consomem H₂. Colombo et al. (2019) afirmam que a hidrólise de proteínas por fermentação escura ocorrerá muito lentamente, além de gerar amônia que pode inibir os produtores de hidrogênio. Portanto, talvez o uso de um soro desnaturado ou desproteínizado (permeado de soro de queijo) seria mais adequado para a produção de bioH₂.

Outra solução que poderia ser aplicada para evitar o consumo de H₂ na etapa de hidrólise de proteínas é o uso de um pré-tratamento do soro. Colombo et al. (2019) usaram efluentes lácteos da produção e ultrafiltração de queijo ricota e realizaram sua exposição a uma etapa de hidrólise enzimática para converter lactose em açúcares mais fermentáveis (como glicose e galactose) antes de submetê-los ao processo de fermentação escura. Os autores obtiveram um volume diário respectivo de H₂ de 3,47 e 5,07 L H₂ d⁻¹ para soro de queijo secundário e permeado concentrado de soro de queijo.

Outro fator essencial que deve ser considerado é a homoacetogênese. Enquanto na Etapa 2 (So) foi estimado que aproximadamente 90% da produção de acetato foi por esta rota, ao longo da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)) os valores médios de [HAc] _homo para U-So (S) e LE-So (S) foram $46,4 \pm 27,2\%$ e $51,8 \pm 25,6 \%$, respectivamente. A homoacetogênese aumentou proporcionalmente à fração de soro no substrato, indicando que a estratégia de adaptação da biomassa não foi suficiente para a inibição de microrganismos homoacetogênicos. Tais organismos, aparentemente foram favorecidos pela água residuária à base de soro, já que vários valores nulos para homoacetogênese foram observados até o 47º dia de operação, quando apenas água residuária à base de sacarose estava sendo usada. No entanto, é importante mencionar que existem outras vias de formação de ácido acético que não envolvem a produção ou consumo de H₂ (por exemplo, heterofermentação láctica e produção de ácido acético e succínico). A alta concentração de ácido láctico e a abundância de *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Bifidobacterium*, que serão discutidos mais adiante, indicam que essas vias de produção de acetato também podem ter ocorrido, além da homoacetogênese.

Uma vez que a produção de H₂ a partir de soro tem se mostrado bastante desafiadora, mesmo em estudos nos quais o pH foi controlado por meio da adição de tampões, a codigestão de soro com outros substratos é uma solução potencial para esse problema. Estudos recentes têm demonstrado ganhos de produtividade de H₂ com o uso dessa estratégia. Lovato et al. (2017) relataram um ganho de produtividade de hidrogênio respectivo de 145% e 27% na codigestão de soro e glicerina em comparação com a digestão anaeróbia de cada um sozinho. Ramos e Silva (2018) aumentaram o HY em 82% ao adicionar soro à vinhaça e obtiveram um HY máximo de 1,01 mmol H₂ g⁻¹ DQO. Marchetti e Vasmara (2019) avaliaram o efeito do soro desproteínizado na codigestão de esterco suíno e obtiveram altas concentrações de ácidos graxos voláteis. É importante notar que todos esses estudos usaram a suplementação de álcalis para controlar o pH. No entanto, seria de grande interesse estudar a codigestão de soro com

outros substratos sem uso de álcalis, não apenas para a produção de bioH₂, mas também de outros subprodutos da digestão anaeróbia, como os AO.

De uma maneira geral, apesar de ambos os reatores não terem apresentado produção de H₂ satisfatória e estável com o soro de queijo, pode-se afirmar que quando houve produção de H₂, ou seja, quando os reatores foram alimentados por sacarose, o reator UASB apresentou uma produção mais estável e também apresentou um valor máximo de HY (5,8 mol H₂ mol⁻¹ sacarose_{consumida}), mais alto do que o reator LE (3,0 mol H₂ mol⁻¹ sacarose_{consumida}).

9.2.2 Produção de ácidos orgânicos e solventes

A Figura 6a apresenta a concentração média de metabólitos e a Figura 7a mostra o seu rendimento médio na Etapa 1 (S). Nesta etapa, os ácidos láctico, acético, butírico e o etanol apresentaram as maiores concentrações em ambos os reatores, enquanto os ácidos propiônico e valérico estavam em baixas concentrações, representando menos de 2% (Figura 7a). Além disso, houve tendência de redução da produção de ácido láctico acompanhada de aumento da produção de bioH₂ a partir do 49º dia de operação. A rota do acetato, em especial, explica os elevados valores de PVH e HY obtidos neste estudo e por Mota et al. (2018), que também observaram um aumento na produção e rendimento de H₂ acompanhado por uma redução na concentração de HLa, HPr e HVa. A formação de lactato envolve o consumo de NADH e piruvato, consequentemente reduzindo o potencial de produção de bioH₂ devido à competição por substrato, enquanto propionato e valerato são produzidos com o consumo de H₂, reduzindo o rendimento geral.

Vários autores relatam uma diminuição no HY quando há um aumento na concentração de ácido láctico (ARIMI et al., 2015; GOMES et al., 2015; SAADY, 2013) porque a via do lactato é energeticamente menos favorável. Bactérias lácticas têm sido apontadas como inibidoras de produção de H₂ devido à competição por substrato, substituição da fermentação de hidrogênio por fermentações de ácido láctico e etanol e produção de peptídeos antimicrobianos, chamados bacteriocinas (CASTELLÓ et al., 2018; GOMES et al., 2015; SIKORA et al., 2013).

Figura 6 – Concentrações médias de metabólitos solúveis correspondentes a cada condição da (a) Etapa 1 - U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So (S) e (e) LE-So (S) para processamento de soro de queijo.

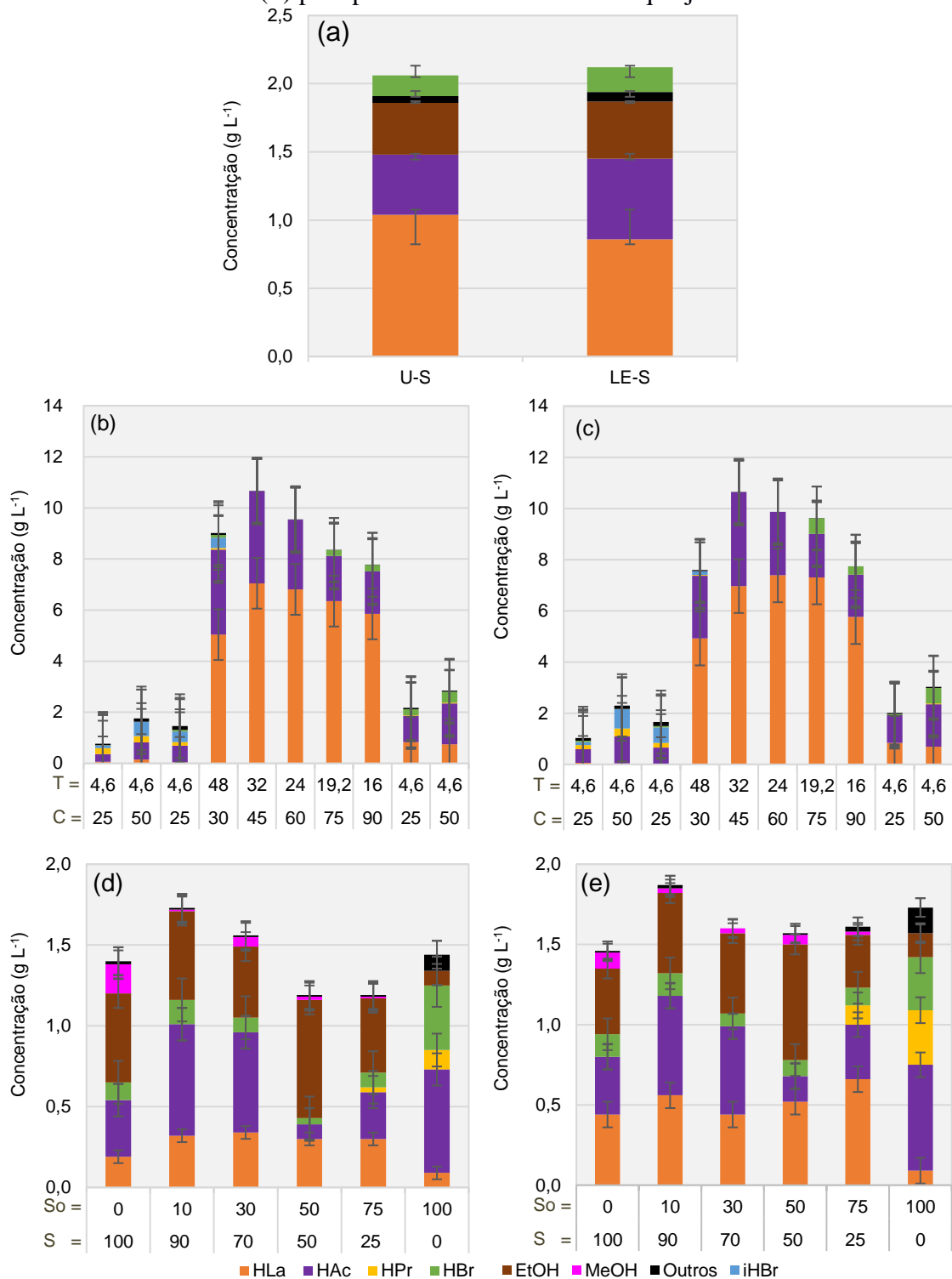
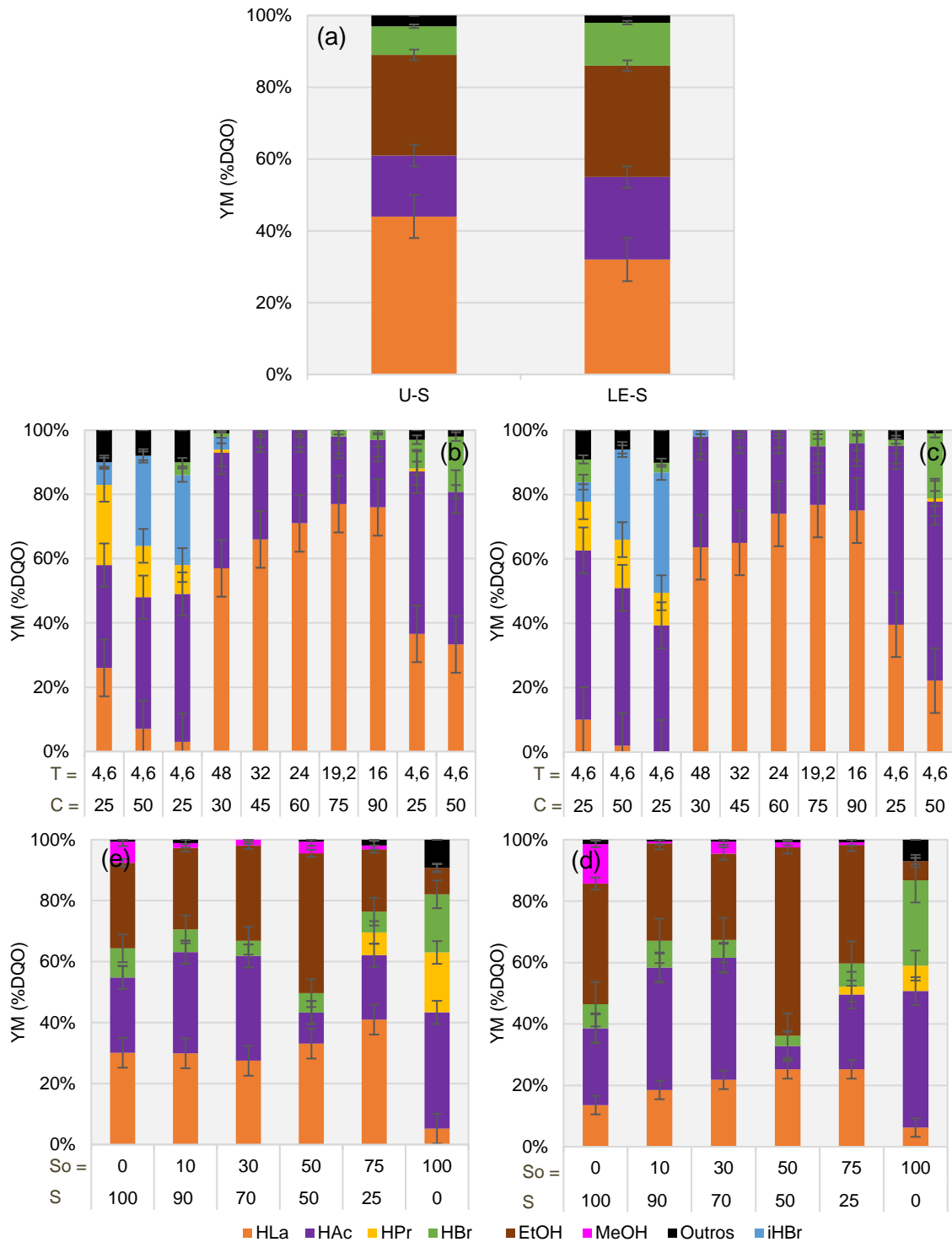


Figura 7 – Rendimentos médios de metabólitos solúveis (YM) correspondentes a cada condição da (a) Etapa 1 - U-S e LE-S, Etapa 2 - (b) U-So e (c) LE-So, e Etapa 3 - (d) U-So(S) e (e) LE-So(S) para processamento de soro de queijo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Sínglas: U –UASB; LE - leito fixo estruturado; S – sacarose (%); So – soro de queijo (%); So (S) – S (adaptação) e So (operação); T – TDH (horas); C - COV (g DQO L⁻¹ d⁻¹); HLa – ácido láctico; HAc – ácido acético; HPr – ácido propiônico; HBr – ácido butírico; EtOH – etanol, MeOH – metanol; iHBr – ácido isobutírico.

A fermentação do etanol em conjunto com a produção de H₂ é relatada por vários autores como favorável (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT e WEVER, 2016; ARIMI et al., 2015; HWANG et al., 2004; MOTA et al., 2018). Embora Arimi et al. (2015) e Hwang et al. (2004) relatam a produção de H₂ junto com etanol sob valores de pH entre 4,5-5,0, há indícios de que esse tipo de fermentação pode ser favorecido em pH abaixo de 3,0. Essa condição foi observada por Mota et al. (2018), que obtiveram uma fração de etanol de 27% da DQO correspondente aos metabólitos solúveis, concomitantemente com a produção contínua de H₂. Reforçando esta afirmação, na Etapa 1 (S), em que foi obtida produção relevante de H₂ ao longo de toda a operação sob pH inferior a 3,0, também foi observada fermentação etanólica, perfazendo uma respectiva proporção média de etanol de 28 ± 14% e 31 ± 13% do YM nos reatores UASB e LE. Na Etapa 2 (So), em que a produção de H₂ foi praticamente zero, a concentração de etanol foi desprezível (Figura 6b e 6c, Figura 7b e 7c).

A rota de produção concomitante de acetato e etanol também representou um percentual significativo da sacarose acidificada nos reatores U-S e LE-S, respectivamente 34 ± 16% e 41 ± 14%. De acordo com Anzola-Rojas; Zaiat e Wever (2016), a produção de H₂ via fermentação do tipo etanol pode ser um caminho atraente produzindo até 2 mols de H₂ por mol de etanol (Reação 5), semelhante à fermentação do tipo ácido butírico (Reação 2). Além disso, nesta via, a produção de ácido propiônico pode ser minimizada, melhorando a estabilidade do processo anaeróbico, o que pode ser muito vantajoso para o próximo estágio metanogênico. Embora a via do acetato possa produzir até 4 mols de H₂ por hexose (Reação 1), a produção pela via exclusiva do acetato raramente leva à formação de 4 mols devido à inibição de enzimas (NFOR) que atuam na formação de H₂ por a via NADH (SIKORA et al., 2013).



Apesar da baixa produção de H₂ na Etapa 2 (So), tal estratégia de operação sem ajuste de pH mostrou-se promissora para a obtenção de outros produtos da fermentação escura como os ácidos láctico e acético, que apresentaram altas concentrações (Figura 6b e 6c) e altos valores de proporção (Figura 7b e 7c) para ambos os reatores. Os melhores resultados para ácido láctico foram obtidos em uma COV de 30-90 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e TDH de 48-16 h. Dentro desta faixa de condição, o reator UASB apresentou uma concentração média de ácido láctico de 5,04-7,05 g L⁻¹ e uma proporção de 57-77%, enquanto o LE apresentou respectivamente 4,92-7,39 g L⁻¹ e 63-76%. Para o ácido acético, os melhores resultados de concentração foram obtidos sob uma

COV de 30-60 gDQO L⁻¹ d⁻¹ e TDH de 48-24 h, quando o reator UASB apresentou uma concentração média de 2,73-3,61 g L⁻¹ e o LE apresentou 2,45-3,67 g L⁻¹. Em relação à proporção de ácido acético, uma COV de 25-50 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e um TDH de 4,6 h foram as melhores condições, o que proporcionou um resultado de 47-51% para o UASB e 55-56% para o LE.

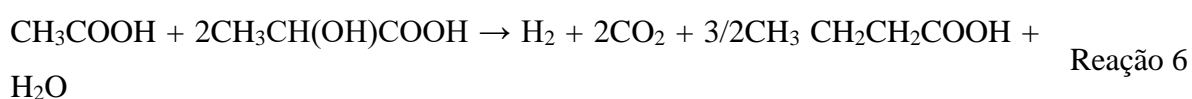
Do ponto de vista da engenharia de bioprocessos, os AO ainda são vistos principalmente como precursores da produção de metano, enquanto sua produção para uso direto é tradicionalmente realizada a partir de fontes de combustível fóssil por rotas químicas (ZACHAROF e LOVITT, 2013). Portanto, relativamente pouca atenção tem sido dada à recuperação de AO a partir da fermentação escura, apesar de serem produtos de alto valor agregado. O ácido láctico, especificamente, é um ácido carboxílico promissor para produção em pH baixo porque tem um pKa de 3,9, o qual é menor do que o pKa dos ácidos graxos voláteis (AGV). Desta forma, menos ácidos estão em sua forma protonada em um pH baixo, o que diminui a inibição do produto por ácidos protonados permitindo maiores concentrações de HLa em comparação com AGV (BONK et al., 2017). Além disso, estudos sugerem que uma alta seletividade pode ser alcançada para o ácido láctico em relação a outros produtos (BONK et al., 2017; KIM et al., 2012).

Em uma revisão sobre a fermentação do soro a ácido láctico, Prazeres; Carvalho; Rivas (2012) afirmam que uma alta produtividade de 11-52 g HLa L⁻¹ é relatada apenas com a suplementação de nutrientes por meio da codigestão com outro tipo de substrato. Sem esta suplementação, produtividades menores, na faixa de 3,8-12 g L⁻¹, foram obtidas sob valores de TDH de 48-56 h e temperaturas de 23-37 °C (PLESSAS et al., 2008; TANGO; GHALY, 1999; VASALA; PANULA; NEUBAUER, 2005), limitando a aplicação da produção de ácido láctico a partir de soro em escala industrial. É importante destacar que na Etapa 2 (So), foram obtidas as respectivas produções máximas de HLa para os reatores U-So e LE-So de 8,5 e 9,6 g HLa L⁻¹, com uma COV de 60 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e um TDH de 24 h. Apesar desses resultados ficarem um pouco abaixo se comparados aos valores relatados para alta produtividade (11-52 g L⁻¹ ou 0,46-1,96 g L⁻¹ h⁻¹) por Prazeres; Carvalho; Rivas (2012), eles foram obtidos sem nenhum tipo de adição de nutrientes e utilizando apenas soro de queijo como substrato. Neste estudo, produtividades máximas de 0,35 e 0,4 g L⁻¹ h⁻¹ (17 g L⁻¹ para um TDH de 48 h) foram obtidas para os reatores U-So e LE-So respectivamente.

Na Tabela 7 são apresentados os valores médios de YHLa na Etapa 2 (So). Os reatores U-So e LE-So apresentaram YHLa máximo de 44,3 e 58,4 mg DQO g⁻¹ DQO, respectivamente.

Luongo et al. (2019) relataram um Y_{HLA} máximo de $0,37 \text{ g DQO}_{HLA} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{So}$ para fermentação de soro em reatores operados em modo de batelada repetida, sem controle de pH. Os autores também relataram concentração máxima de ácido láctico de $20,1 \text{ g L}^{-1}$, e esses resultados foram obtidos em uma faixa de valores de pH de 3,4-3,6, muito próxima a deste estudo, no qual os reatores apresentaram os melhores resultados de produção de HLa em uma faixa de pH de 3,2-3,5.

Além de sua aplicação direta na indústria, o ácido láctico pode ser um precursor na produção de H_2 , o que poderia explicar a alta proporção de rendimento de HLa observada ao longo da Etapa 1 (S). Embora melhores resultados de produção de H_2 tenham sido acompanhados por uma diminuição da concentração de HLa, como mencionado anteriormente, este ácido esteve sempre presente nesta etapa, correspondendo a pelo menos 16% do rendimento de ambos os reatores. Matsumoto; Nishimura (2007) descreveram pela primeira vez a produção de $bioH_2$ a partir de HAc e HLa por fermentação e propuseram uma rota metabólica a partir dos resultados experimentais obtidos (Reação 6). Kim et al. (2012) usaram HLa como substrato para aumentar a eficiência da produção de hidrogênio, e Baghchehsaraee et al. (2009) demonstraram que a adição de HLa a um efluente sintético à base de amido poderia melhorar a produção de hidrogênio acompanhada pela formação de maiores quantidades de HBU como metabólito aquoso predominante.



Nas Figura 6d e 6e são apresentadas as concentrações de metabólitos na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), e as Figura 7d e 7e apresentam suas proporções médias. Houve predomínio das rotas metabólicas fermentativas associadas à produção de HAc, HLa e EtOH até a condição em que a proporção de sacarose e soro no substrato era de 50% em ambos os reatores. Porém, a partir do momento em que a concentração de soro no substrato foi aumentada para 75%, houve uma alteração nas rotas metabólicas implicando na prevalência de HBU e HPr para ambos os reatores e HVa principalmente para o reator LE-So. Tais mudanças também foram acompanhadas por uma redução na produção de EtOH, indicando a substituição do acetato-etanol por outras vias de fermentação, o que é consistente com os baixos valores de produção de H_2 também observados (Figura 5d e 5e).

Tabela 7 – Rendimento médio de metabólitos (YM) para cada condição em cada etapa e valores médios de rendimento de ácido láctico (YHLa) na Etapa 2 (So) para processamento de soro de queijo.

Etapa 1 - Sacarose						
Período (d)			YM (%) U-S		YM (%) LE-S	
1 - 60			61 ± 18		68 ± 16	
Etapa 2 – Soro de queijo						
Período (d)	COV (g DQO L⁻¹ d⁻¹)	TDH (h)	YM (%) U-So	YM (%) LE-So	YHLa U-So (mg DQO g⁻¹ DQO)	YHLa LE-So (mg DQO g⁻¹ DQO)
1 - 14	25	4.6	18 ± 3	41 ± 12	0	0
15 - 25	50	4.6	32 ± 1	41 ± 8	0	0
26 - 44	25	4.6	33 ± 8	45 ± 3	0	0
45 - 63	30	48	17 ± 1	15 ± 4	44,3	33,7
64 - 79	45	32	15 ± 1	15 ± 4	31,2	26,9
80 - 95	60	24	16 ± 2	17 ± 3	28,9	46,6
96 - 115	75	19.2	15 ± 10	20 ± 14	30,3	58,4
116 - 131	90	16	11 ± 5	12 ± 1	31,2	36,5
132 - 141	25	4,6	48 ± 0	44 ± 0	30,7	5,2
142 - 156	50	4,6	30 ± 22	40 ± 4	22,0	27,7
Total (1-156)	25 - 90	4,6 - 48	21 ± 9	26 ± 15	-	-
Etapa 3 – sacarose (adaptação) + soro (operação)						
Período (d)	Fração de sacarose (%)	Fração de So (%)	YM (%) U-So(S)		YM (%) LE-So(S)	
1-47	100	0	50 ± 18		47 ± 11	
48-59	90	10	56 ± 10		59 ± 4	
60-73	70	30	56 ± 8		59 ± 14	
74-89	50	50	46 ± 11		56 ± 14	
92-101	25	75	43 ± 18		53 ± 32	
102-116	0	100	38 ± 14		47 ± 19	
Total (1-116)	0 - 100	0 - 100	49 ± 12		54 ± 12	

Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: U – UASB; LE – leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – So (operação) e sacarose (adaptação).

A estratégia de adaptação da biomassa influenciou os metabólitos produzidos, mesmo com o mesmo substrato (soro), na Figura 6 é possível observar claramente que a estratégia adotada na Etapa 2 (reatores alimentados apenas com soro) favoreceu a produção dos ácidos acético e láctico, enquanto a estratégia adotada na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)) proporcionou uma maior diversidade de metabólitos. Uma vez que *Lactobacillus* frequentemente inibe o crescimento de outras bactérias por meio da produção de bacteriocina (GOMES et al., 2015), a estratégia adotada na Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)) pode ter sido benéfica, especialmente se o objetivo for reduzir a produção de ácido láctico (PERNA et al., 2013) e a proporção de *Lactobacillus*.

Um estudo recente sobre a produção de AGV a partir da fermentação de soro em um reator operado em bateladas sequenciais anaeróbio conduzido por Lagoa-Costa; Kennes e Veiga (2020) mostrou um grau de acidificação de 83% e um rendimento de acidificação de 90% $\text{g DQO}_{\text{AGV}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{lactose}}$. No entanto, esses resultados foram obtidos sob um TDH de 1 dia e um tempo de retenção de lodo de 15 dias. É difícil determinar se um metabólito tem uma relação positiva ou negativa com a produção de bioH_2 , pois há informações conflitantes na literatura. Neste estudo, melhores resultados de produção de H_2 foram obtidos concomitantemente com maior YM (Tabela 7), uma vez que as Etapas 1 (S) e 3 (S (adaptação) + So (operação)) apresentaram valores médios respectivos de $61 \pm 18\%$ para U-S, $68 \pm 16\%$ para LE-S, $49 \pm 12\%$ para U-So (S) e $54 \pm 12\%$ para LE-So (S) que foram acompanhados pela produção de bioH_2 ao longo das etapas de operação. Por outro lado, na Etapa 2 (So), na qual a produção de bioH_2 foi praticamente nula, ao longo da operação, o YM foi de $21 \pm 9\%$ para U-So e $26 \pm 15\%$ para LE-So.

A direção da via metabólica no processo de fermentação pode ser afetada por suas condições ambientais: temperatura, pH e a dinâmica da comunidade microbiana (MARQUES et al., 2019). Apesar dos diversos metabólitos e produtos obtidos neste estudo em relação aos diferentes substratos utilizados e estratégias adotadas para operação, pode-se dizer que todas as etapas apresentaram resultados consistentes com o que foi relatado por Mota et al. (2018). Em resumo, pH menor que 3,0 pareceu ser uma condição ideal para produção de bioH_2 sem nenhum tipo de controle de pH e, nesta condição, a rota metabólica de produção concomitante de acetato, etanol e H_2 predominou. Para valores de pH maiores que 3,0, outras rotas metabólicas que estão associados à baixa produção e rendimento de H_2 prevaleceram, o que está de acordo com os microrganismos encontrados conforme discutido no item 9.2.3.

9.2.3 Composição da comunidade microbiana

Após o corte, um total de 3.330.875 sequências foram recuperadas, com um comprimento médio de 402 bp. O número de *amplicon sequence variants* (ASV) observadas atingiu um platô para todas as amostras quando a profundidade de sequenciamento atingiu aproximadamente 100.000 sequências (Figura 8), indicando que o esforço de sequenciamento foi suficiente para cobrir a diversidade bacteriana presente nas amostras. Com base nas ASV, os valores do índice de diversidade de Shannon foram 6,5, 2,8, 3,2, 4,6, 4,5, 4,4 e 4,1 para inóculo, reatores U-S, LE-S, U-So, LE-So, U-So (S) e LE-So (S), respectivamente. Outros índices de diversidade alfa apresentaram o mesmo padrão (Tabela 8). Os menores valores de diversidade obtidos para os reatores U-S e LE-S provavelmente foram resultantes das condições ácidas extremas observadas nesses reatores. Mota et al. (2018) também encontraram baixa diversidade nos reatores acidogênicos sob pH abaixo de 3,0, com valores de índice de Shannon de 0,7 a 1,4 (baseado em unidades taxonômicas operacionais - UTO).

Tabela 8 - Índices de diversidade alfa das comunidades microbianas do inóculo e reatores para processamento de soro de queijo.

Nome da amostra	Etapa	Efluente inicial	Efluente	Shannon	ace	simpson	chao1	margalef	ASV observadas
Inoc30	Inóculo			6,5	583,0	0,97	583,0	45,3	577
U-S	1	Sacarose	Sucrose	2,8	58,0	0,77	58,0	4,6	58
LE-S	1	Sacarose	Sucrose	3,2	85,3	0,84	85,0	6,5	85
U-So	2	So	So	4,6	116,4	0,93	116,0	9,1	116
LE-So	2	So	So	4,5	137,5	0,92	137,0	10,3	134
U-So (S)	3	Sacarose	So	4,4	145,2	0,90	145,0	10,7	142
LE-So (S)	3	Sacarose	So	4,1	104,0	0,90	104,0	7,6	103

Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Nota: Tabela feita utilizando Qiime2 versão 2019.10 (Bolyen et al., 2019) e visualizado utilizando Qiime2view (<https://view.qiime2.org/>).

Siglas: U – UASB; LE – leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – sacarose (adaptação) e So (operação).

O agrupamento de amostras com base nas matrizes de distância de Bray-Curtis apresentou maior similaridade entre os reatores da mesma etapa de operação (U-S e LE-S; U-So e LE-So; U-So (S) e LE-So (S)) (Figura 9). Além disso, os reatores U-So (S) e LE-So (S) estavam mais próximos dos reatores U-So e LE-So do que dos reatores U-S e LE-S. Estes resultados sugerem que as condições fermentativas, particularmente substrato e pH, foram os

principais determinantes da estrutura da comunidade microbiana, independentemente do inóculo ou enriquecimento microbiano durante a partida e do tipo de reator.

No inóculo, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi* e *Euryarchaea* foram os filos mais abundantes, respondendo juntos por aproximadamente 80% do total de microrganismos. As condições acidogênicas claramente selecionaram membros do filo *Firmicutes*, que representaram aproximadamente 9%, 81%, 97%, 77%, 65%, 55% e 68% da comunidade bacteriana total no inóculo, reatores U-S, LE-S, U-So, LE-So, U-So (S) e LE-So (S), respectivamente. Membros de *Firmicutes* foram encontrados em alta abundância em reatores acidogênicos, e a produção de AGV foi correlacionada com sua presença (LI et al., 2019). Na Figura 10 é possível observar os gêneros prevalentes nos reatores, conforme as sequências foram agrupadas em nível de gênero (de acordo com o classificador de taxonomia baseado em sklearn em Qiime2, Dada2). As ASV mais abundantes nos reatores são mostradas na Tabela 9 e seus parentes mais próximos são representados em uma árvore filogenética (Figura 11).

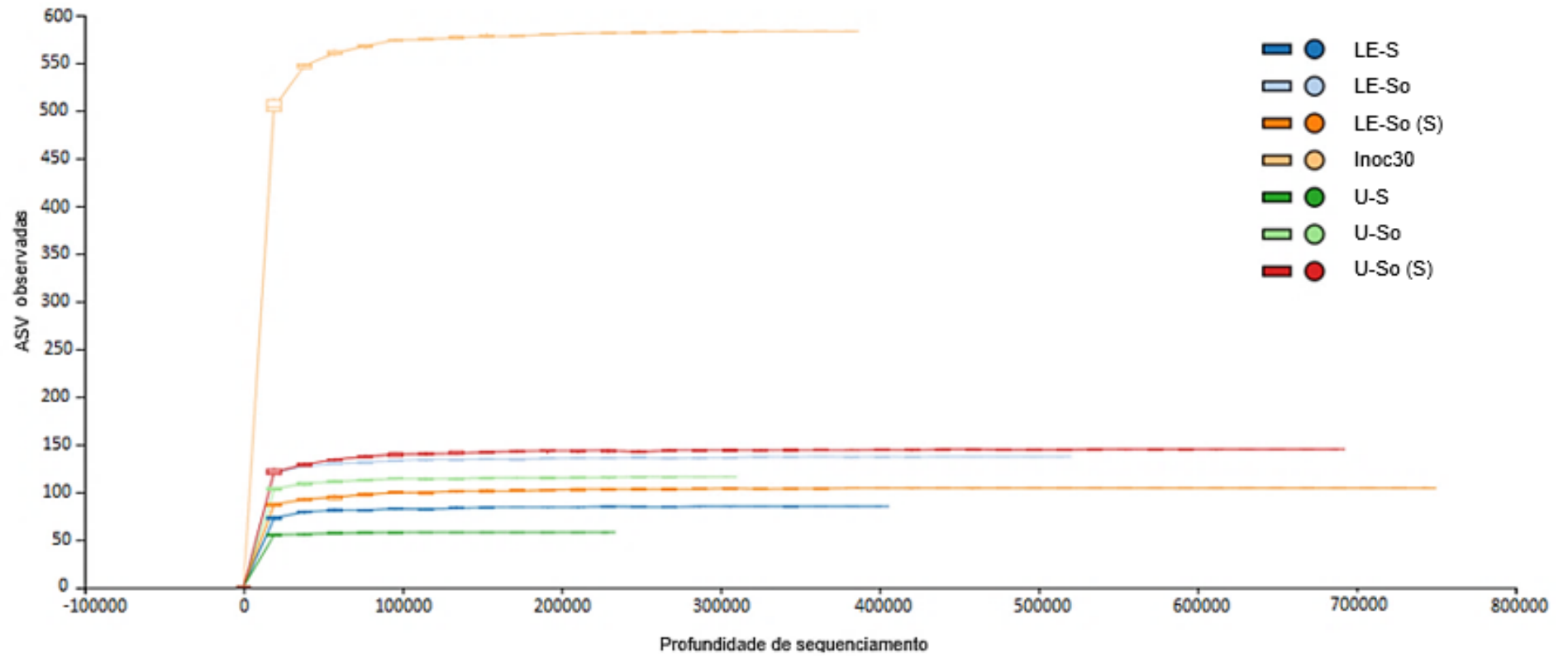
Na Etapa 1 (S), a ASV0002, relacionada a *Ethanoligenens harbinense*, foi responsável por aproximadamente 42% e 14% do total de bactérias nos reatores U-S e LE-S, respectivamente (Tabela 9). Além disso, a abundância de ASV0003, que estava relacionada com *Clostridium acidisoli* (pertencente à categoria do gênero *Clostridium sensu stricto 12* na Figura 8, foi notavelmente maior nos reatores U-S e LE-S, correspondendo a 12% e 19% da comunidade bacteriana total, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com Mota et al. (2018), que encontraram essas bactérias como membros predominantes da comunidade microbiana em um reator UASB acidogênico alimentado com sacarose que apresentou alto rendimento de H₂ (3,4 mol H₂ mol⁻¹sacarose) e produção estável de H₂ em condições ácidas extremas (pH 2,7). *C. acidisoli* pode viver em ambientes extremamente ácidos e produzir H₂ junto com acetato e butirato da fermentação do açúcar (KUHNER et al., 2000). *E. harbinense* é reconhecida por sua capacidade de produzir grande quantidade de H₂ em baixo pH por meio da via acetato-etanol (LI et al., 2019; ZHAO et al., 2010).

Também foi observada uma abundância significativa (14%) de ASV0013, pertencente ao gênero *Acetobacter*, no reator U-S. *Acetobacter* é um gênero de bactéria aeróbia que oxida o etanol em acetato (BRENNER; KRIEG e STALEY, 2007). Membros de *Paenibacillus*, um gênero de bactéria aeróbia facultativa (PRIEST, 2015), foram favorecidos na Etapa 1 (S) do reator LE-S, conforme indicado pela alta proporção de ASV0006 e ASV0008, representando 45% do total de bactérias neste reator. ASV0006 e ASV0008 foram intimamente relacionados a

Paenibacillus chibensis, que é uma bactéria aeróbia redutora de nitrato que produz ácido, mas não gás a partir de açúcares (PRIEST, 2015). Esses resultados indicam que o oxigênio pode ter entrado acidentalmente nos reatores U-S e LE-S na Etapa 1 (S), permitindo o crescimento de *Acetobacter* e *Paenibacillus spp.*, respectivamente. Além disso, a presença de oxigênio inibe diretamente *Ethanoligenens* e *Clostridium*, bactérias anaeróbias estritas e produtoras de H₂, o que provavelmente prejudicou a produção estável de bioH₂ ao longo do tempo na Etapa 1 (S) (Figura 5a).

Os reatores alimentados com soro (Etapas 2 e 3) apresentaram alta abundância de não produtores de hidrogênio, tais como membros de *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* e *Selenomonas*. O gênero *Prevotella* compreende bactérias anaeróbias, não formadoras de esporos, com metabolismo moderadamente fermentativo, que produzem principalmente ácidos acético e succínico e, em níveis mais baixos, ácidos láctico e isobutírico, rendendo um pH final de 4,5-5,2 (SHAH; COLLINS, 1990). A abundância dessas bactérias sobre os produtores de hidrogênio pode explicar sua baixa produção de H₂. No entanto, *Prevotella* e *Bifidobacterium* são reconhecidos por sua capacidade de quebrar substratos complexos (CABROL et al., 2017; GOMEZ-ROMERO et al., 2014), provavelmente desempenhando um papel importante na etapa de hidrólise da fermentação do soro.

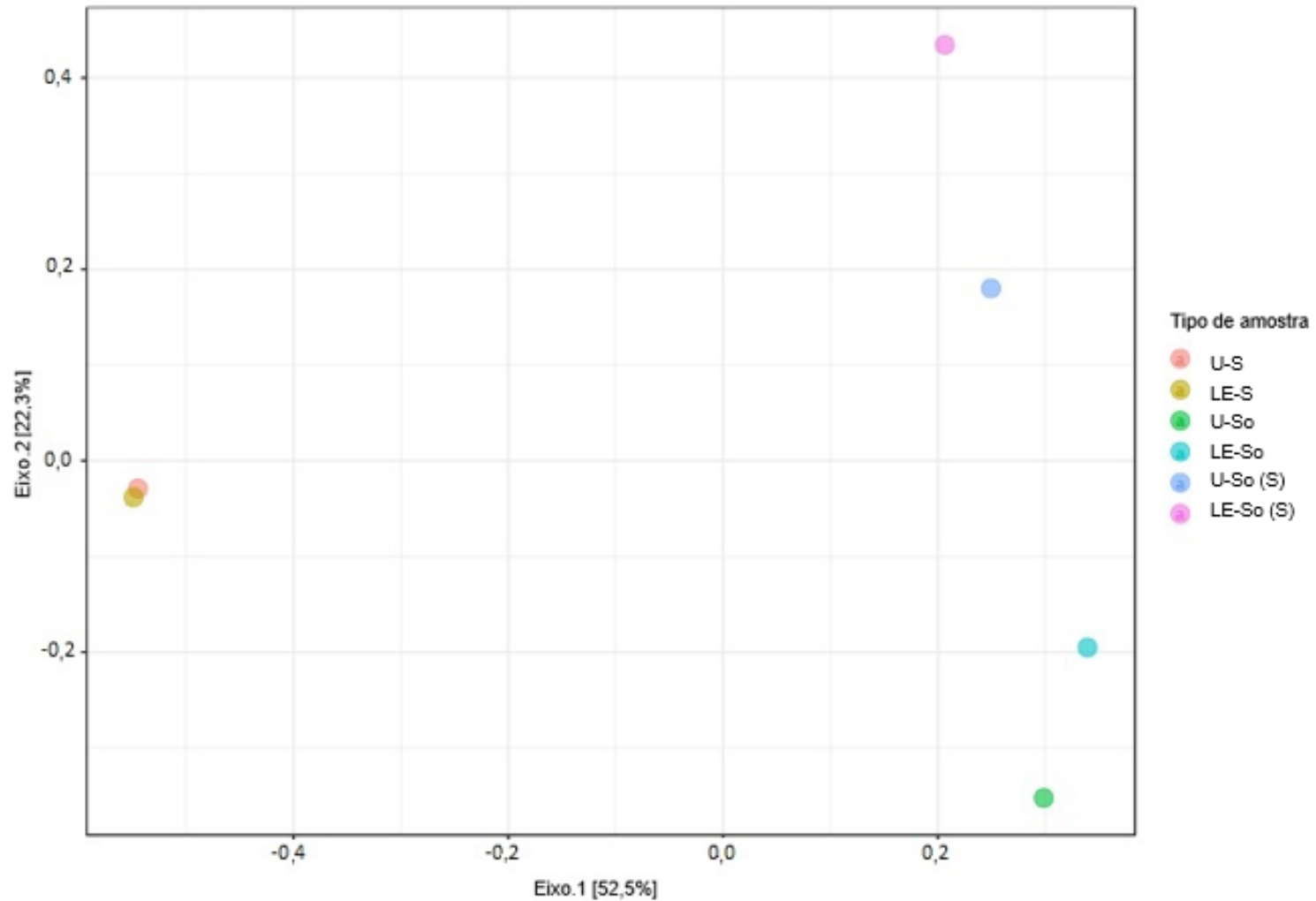
Figura 8 - Curva de rarefação baseada em contagens de sequência para processamento de soro de queijo.



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Siglas: U – UASB; LE – leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – sacarose (adaptação) e So (operação).

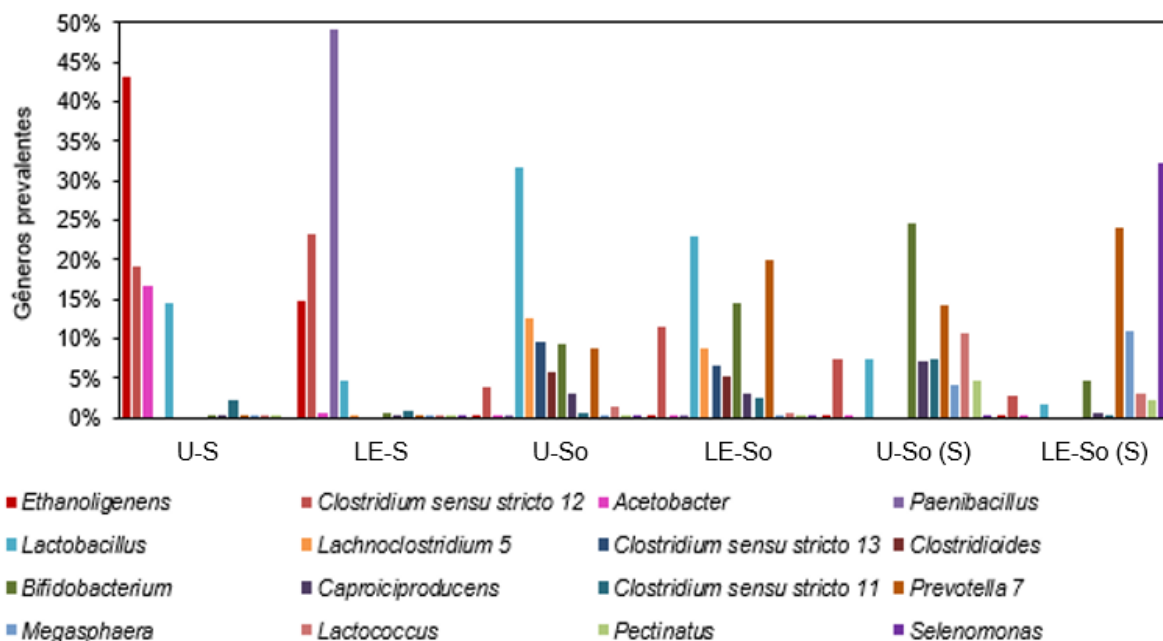
Figura 9 – Gráfico 2D de microbiomas Bray-Curtis PCoA para processamento de soro de queijo.



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Siglas: U – UASB; LE – leito fixo estruturado; S – sacarose; So – soro de queijo; So (S) – sacarose (adaptação) e So (operação).

Figura 10 - Gêneros prevalentes nos reatores U-S e LE-S (Etapa 1), U-So e LE-So (Etapa 2) e U-So (S) e LE-So (S) (Etapa 3) ao final da operação para processamento de soro de queijo.



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

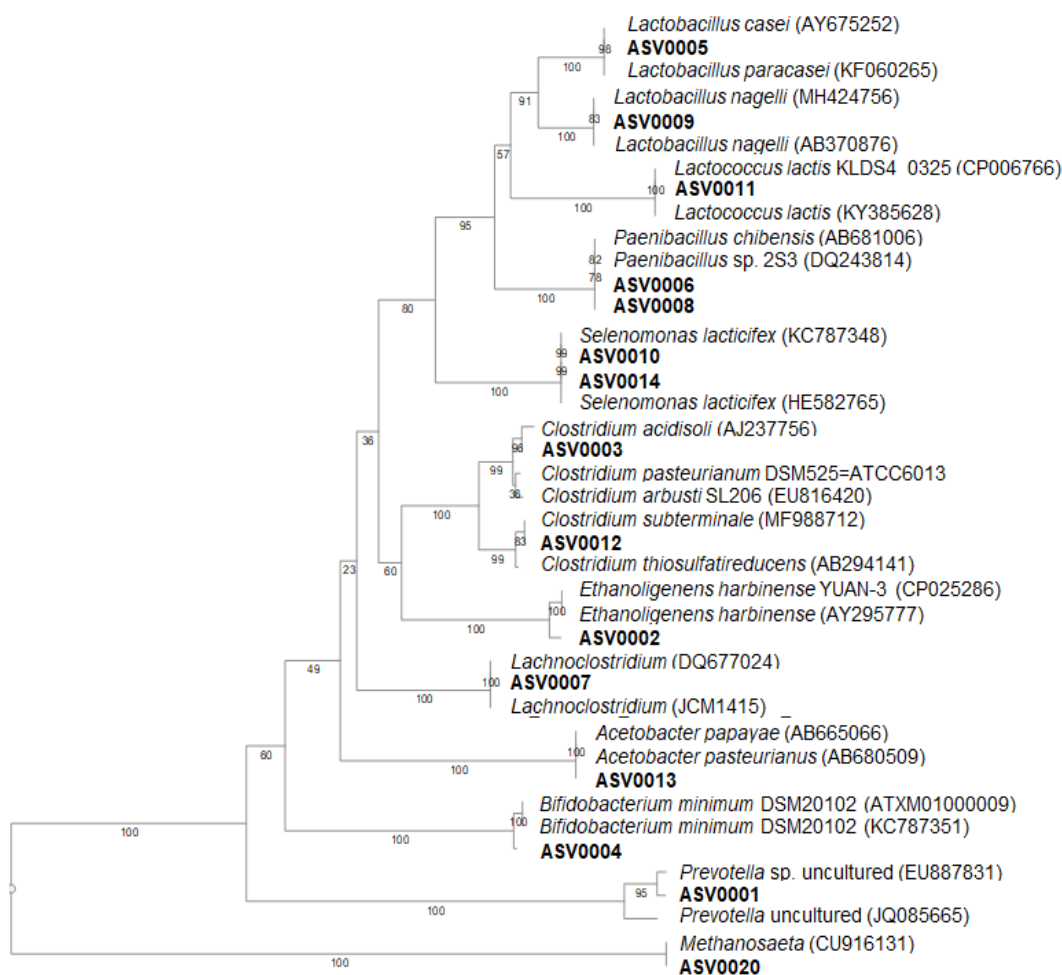
Siglas: U – UASB; LE – leito fixo estruturado; S – sacarosa; So – soro de queijo; So (S) – sacarose (adaptação) e So (operação).

Enquanto ao final da operação da Etapa 2 (So) nos reatores U-So e LE-So o gênero *Lactobacillus* representou 31,7% e 22,9% do total de bactérias, respectivamente, ao final da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)), nos reatores U-So (S) e LE-So (S), este gênero representou apenas 7,5% e 1,7%, respectivamente. A redução de *Lactobacillus* é desejada para a produção de hidrogênio. Vários estudos relatam a presença de lactobacilos em reatores acidogênicos alimentados com soro devido à sua capacidade de fermentar lactose (GOMES et al., 2015), e uma relação inversa entre sua proporção e a produção de H₂ é observada (CARRILLO-REYES et al., 2012; GOMES et al., 2015; PERNA et al., 2013). No entanto, a abundância reduzida de *Lactobacillus* foi acompanhada pela prevalência de outros não fermentadores de hidrogênio, especialmente *Bifidobacterium* no reator U-So (S), responsável por 25% do total de bactérias, e *Selenomonas* no reator LE-So (S), responsável por 32 % do total de bactérias. Por outro lado, as principais bactérias produtoras de hidrogênio encontradas nos reatores alimentados com sacarose, membros relacionados com *Ethanoligenens* e *Clostridium acidisoli*, raramente foram encontradas nos reatores da Etapa 3 (S (adaptação) + So (operação)). Uma vez que o pH mudou de valores ~ 2,7 para valores de 3,5 a 4,0, quando a sacarose foi substituída por soro como substrato (Tabela 5), não é possível concluir se essas

bactérias foram amplamente eliminadas ou substituídas por não produtores de hidrogênio devido à composição do soro ou devido ao aumento do pH.

Em suma, os principais produtores de hidrogênio encontrados eram membros afiliados a *Ethanoligenens* e *C. acidisoli*, que foram muito mais abundantes nos reatores alimentados com sacarose e operados em condições ácidas extremas. Por outro lado, os reatores alimentados com soro apresentaram grande abundância de não produtores de hidrogênio, como *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Selenomonas*, que são capazes de quebrar substratos complexos e consumir diretamente compostos do soro.

Figura 11 - Árvore filogenética baseada em genes parciais de rRNA 16S representando os gêneros mais prevalentes nos reatores acidogênicos ao final de cada etapa de operação com soro de queijo e seus parentes mais próximos disponíveis no banco de dados público SILVA.



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Tabela 9 – ASV com abundâncias $\geq 10\%$ nos reatores e inóculo para processamento de soro de queijo.

ASV	Domínio	Filo	Gênero	Função	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3		Inóculo
					U-S	LE-S	U-So	LE-So	U-So(S)	LE-So(S)	
ASV 0001	Bacteria	Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>	Quebra de substrato complexos, produção de ácido acético e succínico	0%	0%	7%	18%	12%	20%	0%
ASV 0002	Bacteria	Firmicutes	<i>Ethanoligenens</i>	Consumo de carboidratos, produção de hidrogênio, ácido acético e etanol	42%	14%	0%	0%	0%	0%	0%
ASV 0003	Bacteria	Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 12</i>	Consumo de carboidratos, produção de hidrogênio, ácido acético, butírico e láctico	12%	19%	1%	0%	1%	0%	0%
ASV 0004	Bacteria	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	Quebra de substratos complexos, produção de ácido acético e láctico	0%	1%	6%	13%	24%	5%	0%
ASV 0005	Bacteria	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	Produção de ácido láctico a partir de hexoses, fermentação de lactose, potencial inibição microbiana pela produção de bacteriocina	0%	0%	15%	9%	4%	0%	0%
ASV 0006	Bacteria	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	Redução de nitrato, consumo de ácidos acético e butírico, produção de ácidos a partir de açúcares	0%	27%	0%	0%	0%	0%	0%
ASV 0007	Bacteria	Firmicutes	<i>Lachnoclostridium</i>	Produção de etanol, ácido acético e hidrogênio a partir da glicose	0%	0%	11%	8%	0%	0%	0%
ASV 0008	Bacteria	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	Redução de nitrato, consumo de ácidos acético e butírico, produção de ácidos a partir de açúcares	0%	18%	0%	0%	0%	0%	0%
ASV 0009	Bacteria	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	Produção de ácido láctico a partir de hexoses, potencial inibição microbiana pela produção de bacteriocina	12%	4%	1%	1%	0%	1%	0%
ASV 0010	Bacteria	Firmicutes	<i>Selenomonas</i>	Produção de ácido acético, propiônico e láctico a partir de glicose e lactose	0%	0%	0%	0%	0%	16%	0%
ASV 0011	Bacteria	Firmicutes	<i>Lactococcus</i>	Produção de ácido láctico a partir de hexoses, potencial inibição microbiana pela produção de bacteriocina	0%	0%	1%	1%	10%	3%	0%
ASV 0012	Bacteria	Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	Atividade proteolítica, degradação de aminoácidos, produção de hidrogênio	0%	0%	10%	6%	0%	0%	0%
ASV 0013	Bacteria	Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>	Oxidação de etanol em ácido acético, consumo de produtos de fermentação (lactato, acetato, etc.)	14%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
ASV 0014	Bacteria	Firmicutes	<i>Selenomonas</i>	Produção de ácido acético, láctico e propiônico a partir da fermentação de glicose e lactose	0%	0%	0%	0%	0%	12%	0%
ASV 0020	Archaea	Euryarchaeota	<i>Methanosaeta</i>	Produção de metano a partir de acetato	0%	0%	0%	0%	0%	0%	13%

Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

9.3 Aplicações práticas e perspectivas de pesquisas futuras

A maioria dos estudos disponíveis na literatura avaliou reatores em batelada, utilizando glicose como substrato e culturas puras, o que não aborda as principais questões relacionadas à aplicação prática de efluentes reais da fermentação escura (BANU et al., 2021). A ampliação desses processos para o modo industrial requer operação contínua. O uso de consórcios microbianos mistos também é uma opção melhor, pois pode tolerar variações de diversos fatores ambientais como pH, temperatura, além de trabalhar com várias composições de substrato e eliminar a necessidade de esterilização do meio. O uso de culturas puras resulta em muitas desvantagens, como complicações na preservação, problemas de contaminação e mudança nas vias metabólicas (BANU et al., 2020). Outra questão extremamente importante para o dimensionamento do processo é a necessidade de suplementação de alcalinização que os processos de fermentação escura requerem (BANU et al., 2021). Uma alternativa proposta aos reagentes alcalinos que a maioria dos estudos têm utilizado é a recirculação dos efluentes (BLANCO, 2018). Apesar de reduzir os custos operacionais, essa estratégia não os elimina totalmente, pois aumenta o consumo de energia do sistema.

Este estudo mostrou potencial para implementação em escala piloto, uma vez que foi obtida produção de AO (principalmente ácido láctico) a partir de soro (um efluente real e complexo), com requisitos operacionais mínimos exigidos. Além disso, foi utilizado um lodo de cultura mista sem nenhum tipo de pré-tratamento. Este estudo também não exigiu nenhum tipo de controle de pH (por adição de reagentes alcalinos ou recirculação do efluente), ou descarte de lodo durante a operação, uma vez que o sistema apresentou capacidade de autorregulação. Esses resultados estão extremamente alinhados com o conceito de bioeconomia circular, pois tornam a recuperação de produtos de interesse por meio da fermentação escura de efluentes e a prevenção da poluição mais atrativos economicamente atendendo a uma grande demanda dos países em desenvolvimento por tecnologias mais sustentáveis e viáveis e proporcionando um aumento da escala produtiva da geração de bioH₂ e AO, tais como o ácido láctico e acético.

Os resultados obtidos neste estudo abrem um novo campo de investigação na recuperação de recursos por fermentação escura sem tampões em condições extremamente ácidas. Outros efluentes além do soro devem ser investigados não apenas visando a produção de bioH₂, mas também outros metabólitos de interesse como os AO que por si só possuem um grande valor monetário, mas também podem ser utilizados como fonte de carbono para outros

produtos, como metano, biopolímeros ou ácidos graxos de cadeia média mais valiosos por meio do alongamento da cadeia. Embora a caracterização microbiana tenha sido aplicada neste estudo, as funções metabólicas desempenhadas pelos microrganismos não foram totalmente compreendidas por esta abordagem, portanto, uma compreensão profunda das vias metabólicas da degradação do soro durante a acidogênese em um ambiente extremamente ácido e os microrganismos associados a elas também podem ser uma perspectiva para pesquisas futuras, uma vez que é extremamente importante obter os metabólitos desejáveis.

9.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a fermentação acidogênica do soro de queijo é uma abordagem promissora para a produção biológica de ácido láctico. O soro não se mostrou um substrato adequado para a produção de bioH₂ sem ajuste de pH. Os principais produtores de hidrogênio encontrados, bactérias afiliadas *Ethanoligenens* e *Clostridium acidisoli*, foram muito mais abundantes nos reatores alimentados com sacarose e operados em condições ácidas extremas do que nos reatores alimentados com soro, que demonstraram um aumento natural dos valores de pH de abaixo de 3,0 para acima de 3,5. Portanto, o pH abaixo de 3,0 parece ser uma condição ideal para que ocorra a produção de bioH₂ sem adição de tampão, favorecendo a rota metabólica de produção concomitante de acetato, etanol e H₂. No entanto, a alimentação inicial com sacarose proporcionou maior diversidade de metabólitos na Etapa 3 (alimentação inicial com sacarose substituída gradativamente por soro) e redução de *Lactobacillus* quando comparado a Etapa 2 (alimentação apenas com soro), quando os ácido láctico e acético foram predominantes.

10 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR²

A vinhaça de cana-de-açúcar apresenta baixo pH e diversos estudos relatam que a suplementação com alcalinidade é essencial para a estabilidade de sua fermentação escura (DÖLL; FORESTI, 2010; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE e ZAIAT, 2015a; 2015b; FERRAZ JÚNIOR et al., 2016; FUESS et al., 2016; 2017a; FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019). No conceito de biorrefinaria, a redução ou mesmo eliminação de agentes alcalinizantes pode ser extremamente vantajosa do ponto de vista ambiental e econômico. Nesse contexto, os principais objetivos deste estudo foram (i) avaliar a valorização da fermentação escura da vinhaça pela produção de biohidrogênio (bioH_2), sem nenhum tipo de ajuste de pH; (ii) avaliar a produção de outros metabólitos de valor agregado, como ácidos orgânicos (AO) e solventes em dois reatores UASB semelhantes em condições mesofílicas (U30) e termofílicas (U55); e (iii) fornecer conhecimento para a compreensão da fermentação escura da vinhaça e microrganismos envolvidos.

10.1 Material e métodos

10.1.1 Abordagem experimental e condições operacionais

Dois reatores UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) semelhantes (Figura 12) de 1,4 L foram operados em paralelo e avaliados sob duas condições, mesofílica (30°C) e termofílica (55°C) sem qualquer tipo de ajuste de pH. Os reatores foram identificados, respectivamente, como U30 e U55.

As configurações dos reatores, o substrato inicial e as condições de operação foram estabelecidas com base nas condições ótimas alcançadas por Mota et al. (2018), nas quais um reator UASB acidogênico alimentado com sacarose apresentou produção de hidrogênio estável e o rendimento médio de $3,4 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ sacarose sob temperatura mesófila (30°C) e pH de 2,7. Um reator termofílico também foi avaliado neste estudo, uma vez que a vinhaça de cana-

²Esta etapa do trabalho encontra-se presente no artigo Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of sugarcane vinasse without buffers in mesophilic and thermophilic conditions (RIBEIRO et al., 2021).

de-açúcar é liberada em altas temperaturas (80-90°C) e é comum avaliar seu processamento anaeróbio nessas condições.

Figura 12 - Diagrama esquemático do reator UASB utilizado para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada pela autora.

A biomassa original estava na forma granular, mas foi completamente rompida com um liquidificador, misturada ao substrato em proporção adequada para manter a concentração de 15 g SVT L⁻¹ (SVT, sólidos voláteis totais) e recirculada nos reatores por 3 dias. As condições de operação iniciais e o procedimento de inoculação foram estabelecidos de acordo com a metodologia descrita por Mota et al. (2018) e foram seguidos estritamente de forma idêntica para os dois reatores, U30 e U55. O U30 foi inoculado com lodo de um reator UASB metanogênico (estágio único) tratando água residuária de um abatedouro de aves localizado em Pereiras, São Paulo, Brasil e o U55 foi inoculado com lodo termofílico de uma planta de

processamento anaeróbio de vinhaça de cana-de-açúcar localizada em Pradópolis, São Paulo, Brasil.

Primeiramente, foi realizada uma etapa como controle (Etapa 1 - S). Os reatores foram alimentados com água residuária a base de sacarose, o mesmo substrato utilizado por Mota et al. (2018) composto por 4450 mg L⁻¹ de açúcar demerara (Native®) e uma solução de nutrientes proposta por Jeison (2007), cujas concentrações são apresentadas na Tabela 4. A COV e o TDH foram mantidos em 25 g COD L⁻¹ d⁻¹ e 4,6 h, respectivamente.

Na tentativa de selecionar um microbioma adequado para produzir H₂ juntamente com AO sem a necessidade de qualquer adição de tampão ou pré-tratamento de lodo, os reatores foram inicialmente alimentados com água residuária à base de sacarose, o mesmo substrato utilizado no estudo anterior, com a mesma composição descrita por Mota et al. (2018), 4450 mg L⁻¹ de açúcar demerara (Native®) e uma solução de nutrientes proposta por Jeison (2007), cujas concentrações foram apresentadas na Tabela 4.

Considerando que um microbioma acidogênico e hidrogenogênico foi enriquecido, após 57 dias de operação, a água residuária à base de sacarose foi gradualmente substituída por vinhaça de cana-de-açúcar coletada de uma biorrefinaria produtora de açúcar, etanol e eletricidade em Pradópolis, São Paulo, Brasil. Os períodos operacionais e a caracterização composicional do substrato são detalhados na Tabela 10.

Tabela 10 - Caracterização composicional da vinhaça de cana-de-açúcar ao longo do período de operação dos reatores.

Nomenclatura	100S	S75V25	S50V50	S25V75	V100DQO5	V100DQO10
Período (d)	1-56	57-66	67-79	80-86	86-103	104-114
S ₀ (gDQO L ⁻¹)	5	5	5	5	5	10
Fração de S (%)	100	75	50	25	0	0
Fração de V (%)	0	25	50	75	100	100
pH	6,2 ± 0,6	5,0 ± 0,3	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,0	4,6 ± 0,0
DQOt (mg L ⁻¹)	4593 ± 784	4506 ± 500	4101 ± 529	5120 ± 256	4819 ± 564	9260 ± 668
DQOs (mg L ⁻¹)	4525 ± 717	4193 ± 507	3588 ± 366	4235 ± 412	4324 ± 333	8084 ± 838
Gli (mg L ⁻¹)	0 ^a	117 ± 10	141 ± 5	251 ± 155	470 ± 30	763 ± 99
CH (mg L ⁻¹)	3334 ± 524	2641 ± 743	1546 ± 328	1567 ± 166	936 ± 386	2070 ± 524
HLa (mg L ⁻¹)	>3.9 ^b	81 ± 28	148 ± 37	197 ± 18	280 ± 91	476 ± 41
EtOH (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	11 ± 4	23 ± 6	32 ± 15	34 ± 14	52 ± 8
MeOH (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	0 ± 1	1 ± 2	3 ± 0	4 ± 1	5 ± 0
HAc (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	12 ± 8	67 ± 15	36 ± 44	90 ± 78	249 ± 110
HPr (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	1 ± 3	2 ± 3	0 ± 0	5 ± 14	21 ± 6
HBu (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	3 ± 2	0 ± 1	2 ± 4	0 ± 0	1 ± 3
HVa (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1
i-HVa (mg L ⁻¹)	>2.0 ^b	22 ± 13	15 ± 17	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	4.5	84 ± 3	168 ± 6	217 ± 11	266 ± 16	532 ± 3
SSV (mg L ⁻¹)	0 ^a	51 ± 17	104 ± 26	142 ± 8	142 ± 14	260 ± 31
Fenóis (mg L ⁻¹)	0 ^a	71 ± 59	152 ± 26	228 ± 8	314 ± 26	624 ± 339

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: ^avirtualmente 0; ^blimite mínimo de detecção; S_0 = concentração inicial do substrato; S = sacarose; V = vinhaça diluída; DQOt = demanda química de oxigênio total; DQOs = demanda química de oxigênio solúvel; Gli = glicerol; CH = carboidratos totais; HLa = ácido láctico; EtOH = etanol; MeOH = metanol; HAc = ácido acético; HPr = ácido propiônico; HBu = ácido butírico; HVa = ácido valérico; i-HVa = ácido isobutírico; SSV = sólidos em suspensão voláteis.

A vinhaça utilizada durante o estudo foi sempre diluída. O fator de diluição (ou seja, volume de água por volume de vinhaça) não foi constante e variou ao longo do estudo de 2,9-6,2 vezes, em função da DQO da vinhaça bruta disponível no momento, que variou de 28 a 30 g L⁻¹. Esta diluição foi sempre ajustada de forma a manter uma concentração inicial de substrato (S_0) de aproximadamente 5 g DQO L⁻¹ e uma carga orgânica volumétrica (COV) de 25 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Ao final da operação, a S_0 foi aumentada para 10 g DQO L⁻¹ para a obtenção de uma COV de 50 g DQO L⁻¹ d⁻¹.

10.1.2 Monitoramento do reator, métodos analíticos e avaliação de desempenho

Todas as análises realizadas e seus respectivos procedimentos estão descritos na seção 9.1.2 Monitoramento dos reatores e métodos analíticos. A determinação de glicerol (Gli) foi baseada no método descrito por Greenhill (2004). A vazão do biogás foi monitorada por meio de um dispositivo de medição de gás em forma de U conectado a um software de processamento e ao *headspace* dos reatores. Os detalhes de funcionamento são fornecidos por Gyalai-Korpos et al. (2014).

O desempenho do reator foi avaliado com base nas seguintes variáveis de resposta: conversão de CH (EC_{CH} ; %); conversão de glicerol (EC_{Gli} ; %) (ambas calculadas em termos de concentração, mg L⁻¹) (Eq. 1); composição do biogás (CB; % de H₂, CO₂ e CH₄) (Eq. 3); produção volumétrica de hidrogênio (PVH; mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) (Eq. 4), rendimento de hidrogênio (HY; mol H₂ mol⁻¹.CH_{consumidos}) (Eq. 6); grau de acidificação (%) (Eq. 10); rendimento (Y_{AO} ; mg DQO_{AO} g⁻¹ DQOt_{af}) e produtividade (P_{AO} ; mg DQO_{AO} L⁻¹ d⁻¹) de AO e solventes (Eqs. 11 e 12, respectivamente).

$$\text{Grau de acidificação (\%)} = \frac{DQO_{MS}}{DQOt_{af}} \times 100 \quad \text{Eq. 10}$$

Em que DQO_{MS} corresponde à concentração total (DQO equivalente) de metabólitos solúveis medidos, ou seja, AO e solventes ($\text{gDQO}_{MS} \text{L}^{-1}$) no efluente do reator e $DQO_{t_{af}}$ à DQO total (g L^{-1}) no afluente.

$$Y_{AO} = \frac{DQO_{AO}}{DQO_{t_{af}}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$P_{AO} = \frac{DQO_{AO}}{\Delta t} \quad \text{Eq. 12}$$

Em que DQO_{AO} corresponde à concentração total (DQO equivalente) dos AO e solventes medidos ($\text{gDQO}_{AO} \text{L}^{-1}$) no efluente do reator e Δt se refere a um período de 1 dia.

A distribuição do tamanho de partícula e o diâmetro médio dos inóculos (no início da operação) e a biomassa do lodo de cada reator (no final da operação) foram analisados e, portanto, suas respectivas características puderam ser comparadas nas duas condições de temperatura avaliadas (mesófila e termófila), e as mudanças nas características da biomassa que ocorreram ao longo do estudo puderam ser determinadas comparando cada reator com seus respectivos inóculos. Amostras contendo cerca de 1 g de biomassa foram espalhadas sobre placas de Petri e um estereomicroscópio capturou as silhuetas das partículas 2D (contraste de fase e autofluorescência). As imagens foram então processadas e analisadas por uma sequência de filtros de segmentação e limiar, e os parâmetros de forma 2D que descrevem a silhueta das partículas foram extraídos usando o *software* ImageJ v1.60 (*National Institutes of Health*, EUA). Os diâmetros equivalentes foram obtidos a partir da área 2D das partículas, e a avaliação da distribuição do tamanho de partícula seguiu a distribuição de tamanho de Weibull. Detalhes mais específicos sobre a metodologia e os cálculos realizados são fornecidos por Santana et al. (2016).

O *software* Past® 4.0 foi usado para realizar testes estatísticos. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado inicialmente para verificar a normalidade dos dados e o nível de confiança de 95% foi adotado ($\alpha = 0,05$). Uma vez que a normalidade dos dados foi determinada, o teste t foi usado para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos.

10.1.3 Análise da comunidade microbiana

A caracterização microbiana foi realizada para o U30 em três períodos de operação em relação à alimentação do reator: 100% de efluente à base de sacarose, 50% de efluente à base

de sacarose e 50% de efluente à base de vinhaça de cana-de-açúcar e 100% de efluente à base de vinhaça de cana-de-açúcar. Para o U55, a caracterização microbiana foi realizada somente quando o reator foi alimentado apenas com efluente à base de vinhaça de cana-de-açúcar. Amostras de lodo foram retiradas na porção média do reator, diretamente da manta de lodo. As amostras foram retiradas do U30 nos dias 37, 79 e 114 e do U55 no dia 114. O maior número de amostras do U30 se justifica porque a caracterização microbiana deste reator foi submetida a análises ômicas no âmbito de outro estudo (MOTA et al., [s.d.]).

Maiores detalhes sobre o procedimento utilizado para a realização das análises da comunidade microbiana estão descritos na seção 9.1.4 Análise da comunidade microbiana.

10.2 Resultados e discussões

10.2.1 Produção de bioH₂ e conversão de substrato

A partir do momento em que a vinhaça começou a ser introduzida no substrato de alimentação de ambos os reatores, U30 e U55, houve uma diminuição da produção de H₂ diretamente proporcional à concentração da vinhaça até a sua cessação, quando o substrato era constituído apenas de vinhaça (Figura 13). No entanto, a estratégia de alimentar inicialmente os reatores com sacarose para promover um enriquecimento acidogênico e hidrogenogênico do microbioma foi eficaz principalmente para o U30, conforme ele apresentou desempenho satisfatório na produção de bioH₂, com uma PVH média de $3174 \pm 961 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, enquanto o U55 apresentou uma PVH média de $1124 \pm 634 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ na primeira etapa (100S), quando foi utilizada apenas sacarose. Além do reator U30 ter uma PVH estatisticamente maior do que U55, os valores observados na etapa alimentada apenas com sacarose (100S) foram mais comparáveis ao valor de PVH apresentado por Mota et al. (2018) para um reator UASB alimentado com sacarose, que foi de $4200 \pm 1056 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Para o HY, o mesmo padrão da PVH foi observado com a introdução da vinhaça no substrato de alimentação (Tabela 11). Quando foi utilizada apenas sacarose (100S), os reatores U30 e U55 apresentaram valores médios de HY respectivos de $1,5 \pm 0,7$ e $1,5 \pm 1,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ CH}_{\text{consumidos}}$, que ficaram abaixo dos valores observados por Mota et al. (2018), $3,4 \pm 0,7 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$. Uma alta fração de H₂ no biogás de 71 ± 17 e $68 \pm 12\%$ para U30 e U55, respectivamente, quando a sacarose era o único substrato (100S), indica que a alimentação inicial com sacarose foi uma estratégia bem-sucedida para promover o

enriquecimento do microbioma hidrogeniônico. No entanto, essa estratégia pode não ter sido suficiente para eliminar outros microrganismos hidrogenotróficos que poderiam ser responsáveis pelo consumo de H_2 ou microrganismos que poderiam causar inibição por competição.

Algumas flutuações na PVH foram observadas em ambos os reatores durante a primeira etapa quando a alimentação era constituída apenas por sacarose (S100) e, como pode ser observado na Figura 13, tais flutuações coincidem com uma alta fração de H_2 no biogás. O aumento da pressão parcial de H_2 no *headspace*, com conseqüente aumento da concentração de H_2 dissolvido, influenciou consideravelmente o desempenho da produção de hidrogênio (SIVAGURUNATHAN et al., 2016). Assim, o aumento da porcentagem de H_2 no *headspace*, atingindo 60-80%, resultou na diminuição da PVH como conseqüência do efeito inibitório da pressão parcial de H_2 . Outro fator que pode ter prejudicado o desempenho da produção de hidrogênio é a homoacetogênese, que é uma via metabólica consumidora de hidrogênio, também relacionada a altas pressões parciais de hidrogênio (BUITRÓN et al., 2020). Buitrón et al. (2020) usaram uma estratégia baseada na recirculação do gás do *headspace* para aumentar a liberação de hidrogênio da fase líquida para a fase gasosa em um reator UASB alimentado com efluentes de vinícola e a produtividade de hidrogênio aumentou de $22 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para $62 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Quando a fração da vinhaça no substrato era de 100% (V100DQO10), o U30 apresentou um valor de PVH nulo, enquanto o U55 apresentou um valor extremamente baixo de $34 \pm 41 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabela 11). Nesta condição, foi observado um valor de PVH pontual de $460,98 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ no U55, que é comparável aos valores relatados por Ferraz Júnior; Etchebehere; Zaiat (2015b) e Niz et al. (2019). No entanto, é extremamente importante destacar que este resultado não corresponde a uma produção estável e reflete um pico na produção de $bioH_2$ logo que a condição operacional foi modificada.

Esses picos na produção de H_2 , imediatamente após uma mudança na condição de operação juntamente com uma tendência de instabilidade, foram observados em ambos os reatores ao longo deste estudo e também foram observados nos estudos realizados por Ferraz Júnior; Etchebehere e Zaiat (2015a; 2015b). Sob condições de alta pressão parcial de H_2 , o rendimento de hidrogênio pode ser afetado devido ao fluxo metabólico redirecionado e simultaneamente aumento da formação de lactato e outros solventes, como acetona, etanol e butanol (SIVAGURUNATHAN et al., 2016). Reis et al. (2015) operaram um reator anaeróbio de leito fluidizado alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar com 10 g DQO L^{-1} , e os autores

também utilizaram uma estratégia de partida do reator, condicionando-o para a produção de hidrogênio com um substrato mais simples, a glicose, e adicionaram vinhaça à alimentação gradativamente. Os autores observaram um pico na produção de hidrogênio no início da operação e uma tendência de queda no final da operação. Os autores associaram essa tendência à geração de CH_4 , que ocorreu mesmo com pH baixo, em torno de 4,5, o que não ocorreu neste estudo, pois a produção de CH_4 foi praticamente nula (Figura 13).

Tabela 11 - Valores médios de pH, conversão de carboidratos (EC_{CH}), glicerol (EC_{GH}), fração dos principais compostos no balanço de massa global (BMG $DQO_{ef}/H_2/SSV$), fração dos principais compostos solúveis no efluente de DQO solúvel (DQO_{ef} CH/Pr/MS), rendimento de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em cada condição do U30 e U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.

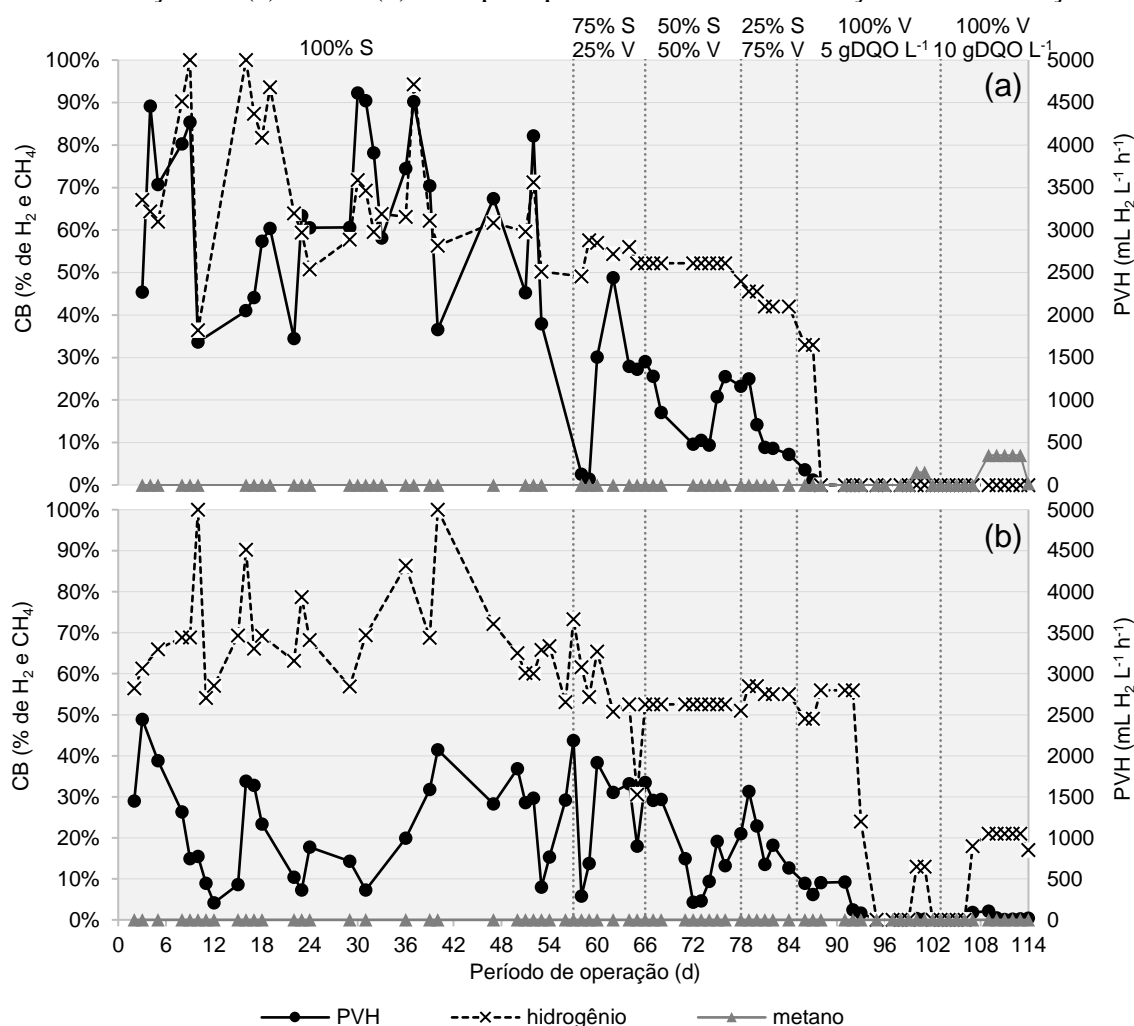
Nomenclatura	100S	S75V25	S50V50	S25V75	V100DQO5	V100DQO10
Período (d)	1-56	57-66	67-79	80-86	86-103	104-114
S_0 (g L⁻¹)	5	5	5	5	5	10
Fração de S (%)	100	75	50	25	0	0
Fração de V (%)	0	25	50	75	100	100
pH U30	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,0	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1
pH U55	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,0	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,3
EC_{CH} U30 (%)^a	69 ± 19	88 ± 9	88 ± 4	90 ± 0	71 ± 11	73 ± 8
EC_{CH} U55 (%)^a	27 ± 12	44 ± 19	60 ± 7	48 ± 10	47 ± 10	60 ± 11
EC_{GH} U30 (%)^a	0*	0 ± 0	64 ± 45	99 ± 1	99 ± 0	100 ± 0
EC_{GH} U55 (%)^a	0*	0 ± 0	2 ± 4	75 ± 11	80 ± 20	71 ± 13
BMG U30 $DQO_{ef}/H_2/SSV$ (%)^b	89±4/6±3/4±2	89±3/3±2/8±1	84±6/2±1/13±5	84±3/1±0/15±3	90±2/0±0/10±2	86±9/0±0/14±9
DQO_{ef} U30 CH/Pr/MS (%)^b	33±20/0±0/67±20	11±11/0±0/89±11	7±1/0±0/93±1	5±2/0±0/95±2	9±4/0±0/91±4	12±7/0±0/88±7
BMG U55 $COD_{ef}/H_2/SSV$ (%)^b	95±3/3±2/2±2	88±2/4±1/8±1	85±8/3±1/12±8	90±2/2±0/8±1	91±3/0±1/9±2	91±3/0±0/9±3
DQO_{ef} U55 CH/Pr/MS (%)^b	75±9/0±0/25±9	47±9/0±0/53±9	21±9/0±0/79±6	15±4/0±0/85±4	15±4/0±0/85±4	14±3/0±0/86±3
HY U30 (mol H₂ mol⁻¹CH_{consumidos})	1,5 ± 0,7	0,8 ± 0,7	0,8 ± 0,7	0,6 ± 0,4	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
HY U55 (mol H₂ mol⁻¹CH_{consumidos})	1,5 ± 1,1	2,1 ± 0,5	1,6 ± 1,0	2,2 ± 1,0	1,0 ± 1,5	0,1 ± 0,1
PVH U30 (mL H₂ L⁻¹ d⁻¹)	3174 ± 961	1193 ± 836	886 ± 353	639 ± 367	17 ± 50	0,0 ± 0,0
PVH U55 (mL H₂ L⁻¹ d⁻¹)	1124 ± 634	1517 ± 315	782 ± 445	595 ± 230	82 ± 163	34 ± 41

Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: * virtualmente 0; ^a calculado em termos de concentração (mg L⁻¹); ^b calculado em termos de DQO.

Siglas: S_0 – concentração inicial do substrato; S - sacarose; V – vinhaça diluída; DQO_{ef} – DQO efluente solúvel, SSV – sólidos em suspensão voláteis; CH - carboidratos totais, Pr – Proteína e MS – metabólitos solúveis (ácidos orgânicos e solventes).

Figura 13 - Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e composição do biogás (CB) em cada condição do (a) U30 e (b) U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: S - sacarose; V - vinhaça diluída.

Um valor de HY pontual de $4,07 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{CH}_{\text{consumidos}}$ também foi observado no U55 sob a condição de 100% de vinhaça (V100DQO10) e embora seja maior do que os rendimentos descritos por outros estudos (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE e ZAIAT, 2015b; FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019; MAGRINI et al., 2020; NIZ et al., 2019; REIS et al., 2015), esse resultado precisa ser avaliado com cautela, pois apenas a conversão de carboidratos foi levada em consideração para os cálculos de HY. No entanto, outros substratos, tais como o lactato e o glicerol também podem ser relevantes (FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019). Uma vez que a vinhaça é um substrato extremamente complexo quanto à sua composição, a determinação de rotas metabólicas em sua fermentação escura ainda é bastante desafiadora e melhores métodos para avaliação de rendimento do reator, que levam

em consideração os diferentes tipos de substrato que compõem a vinhaça, precisam de maior desenvolvimento (FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2019).

Uma mudança no substrato preferencial foi observada principalmente no U55 a partir da condição de 75% de vinhaça (S25V75), pois houve uma diminuição na conversão de CH de 60 ± 7 para $48 \pm 10\%$ e um aumento significativo na conversão de glicerol de 2 ± 4 para $75 \pm 11\%$. Essa mudança também foi observada no U30, que apresentou conversão de glicerol de pelo menos 98%, a partir da condição de 75% de vinhaça (S25V75), chegando a 100% quando apenas vinhaça estava sendo utilizada como alimentação (V100DQO5 e V100DQO10) (Tabela 11).

Embora a conversão do glicerol tenha sido alta e estável, pode não ter sido um aspecto determinante para a produção de bioH₂ a partir da vinhaça, muito provavelmente devido às condições de pH obtidas neste estudo, que sempre estiveram abaixo de 4,5 em ambos os reatores. Mangayil; Karp e Santala (2012) obtiveram uma produção ótima de bioH₂ a partir do glicerol bruto em pH de 6,5 e os autores observaram uma diminuição drástica no rendimento de H₂ em pH igual a 5,0, bem como utilização mínima de substrato. Fuess; Zaiat e Nascimento (2019) também relataram que a fermentação de glicerol pode não ser um aspecto determinante para a produção direta de bioH₂ a partir da vinhaça, uma vez que foram observados níveis estáveis e elevados de conversão de glicerol (geralmente > 95%), acompanhados de produção de bioH₂ relativamente baixa ($521 \pm 132 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) sob pH <5,0.

Alguns substratos críticos na vinhaça, como fenol e sulfato, os quais aumentaram conforme a fração da vinhaça foi aumentada na alimentação, podem prejudicar a produção de bioH₂ por meio de seu efeito inibidor/interferente na biodegradabilidade da fração orgânica da vinhaça (FUESS; GARCIA e ZAIAT, 2018). No entanto, neste estudo, a mudança na comunidade microbiana (induzida por uma mudança no substrato e um aumento no pH), que passou a ser dominada por bactérias não produtoras de H₂ (que são capazes de degradar a vinhaça e adaptadas a pH 4,0-5,0), parece ter sido a principal causa do baixo rendimento de H₂. Outra indicação de que isso pode ter ocorrido, é que existem estudos com 100% de vinhaça e com excelentes resultados na produção de H₂, porém é muito importante ressaltar que esses estudos foram realizados com ajuste de pH (por meio da adição de alcalinizantes) o que resultou em uma faixa de pH acima do utilizado neste estudo (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015b; FUESS et al., 2017a; FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018; NIZ et al., 2019). Portanto, não é possível justificar a baixa produção de H₂ neste estudo devido à complexidade da vinhaça.

Os resultados relativos à produção de bioH₂ neste estudo foram extremamente consistentes com aqueles observados para o processamento do soro de queijo (Capítulo 9) é descrita a avaliação da produção de bioH₂ a partir de soro de queijo sem ajuste de pH, utilizando a mesma estratégia de adaptação de biomassa com sacarose adotada para a vinhaça. Melhores resultados de bioH₂ foram observados quando o reator UASB foi alimentado apenas com sacarose e o pH se manteve em torno de 2,7, com uma PVH média de $2096 \pm 1333 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. À medida que o soro de queijo foi sendo introduzido gradativamente no substrato de alimentação (até a eliminação da sacarose) e o pH aumentou naturalmente para valores próximos de 4,0, e a produção de bioH₂ diminuiu até a sua cessação. Mota et al. (2018) observaram que a diminuição na remoção de sacarose, concentração de AO e produção de bioH₂ coincidiu com aumentos pontuais no pH. Da mesma forma, para o processamento da vinhaça, o U30 apresentou PVH estatisticamente maior do que o U55 quando apenas sacarose foi utilizada como substrato e os valores de pH foram $2,9 \pm 0,1$, enquanto o U55 sempre apresentou valores acima de 3,0 (Tabela 11) concomitante a uma menor produção de bioH₂ (Figura 13).

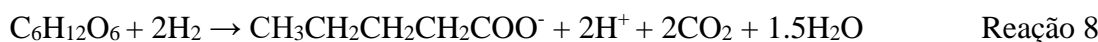
Com base nas informações citadas anteriormente, pode-se inferir que um pH abaixo de 3,0 é um fator crucial para a produção de bioH₂ sem tampões, porém, não se pode afirmar com certeza que este seja o único fator que influenciou a produção de bioH₂, visto que outras variáveis como temperatura, comunidade microbiana e o tipo de substrato também podem ter desempenhado um papel importante. Também existem indícios de que a estratégia de alimentar inicialmente os reatores com água residuária à base de sacarose não se mostrou suficiente para manter um ambiente adequado para bactérias produtoras de hidrogênio conforme a sacarose foi substituída pela vinhaça, resultando em um aumento natural do pH. Talvez a utilização de outros substratos, diferentes do soro e da vinhaça, que possuam um valor natural de pH abaixo de 3,0, além do potencial para a produção de bioH₂, apresentasse melhores resultados. No entanto, é importante destacar que essa estratégia mostrou um potencial de ser propícia para a produção de outros produtos de interesse que serão discutidos no item 10.2.2.

10.2.2 Produção de ácidos orgânicos e solventes

Ao analisar o espectro dos metabólitos produzidos (Figura 14), pode-se afirmar que HAc, H₂Bu, EtOH e HLa (apenas no U30) foram predominantes na primeira fase do estudo quando o substrato de alimentação consistia apenas de sacarose (100S) e houve produção significativa de bioH₂ (Figura 13). Houve queda nas concentrações e níveis de acidificação

correspondentes a esses metabólitos, seguido de aumento gradual do HPr em ambos os reatores e HVa (apenas no U30) (Figura 14b e Tabela 12) quando a sacarose foi gradativamente substituída pela vinhaça. Também foi observada uma queda gradativa na produção de bioH₂ conforme o substrato era trocado por vinhaça.

As vias dos ácidos acético e butírico são as vias metabólicas preferidas para a produção de bioH₂ por fermentação escura (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE e ZAIAT, 2015b; MAGRINI et al., 2020; NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017) (Reações 1 e 2, respectivamente), enquanto HPr e HVa podem estar associados a condições desfavoráveis para que isso aconteça. A fermentação nas vias propiônica (Reação 7) (MAGRINI et al., 2020) e valérica (Reação 8) leva ao consumo de hidrogênio disponível no meio reacional (MOTA et al., 2018). A produção de bioH₂ por via de fermentação do tipo acetato-etanol também pode ocorrer produzindo até 2 mols de H₂ por mol de etanol (Reação 5). Além disso, a produção de ácido propiônico pode ser minimizada nesta via, melhorando a estabilidade do processo (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT; WEVER, 2016). Assim, os metabólitos observados neste estudo são consistentes com os resultados de produção de bioH₂.



Diversos autores também relatam a produção de bioH₂ a partir da fermentação da vinhaça pela via do tipo etanol (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a; LAZARO et al., 2014; REIS et al., 2015) em uma faixa de pH entre 4,6-6,5 (ARIMI et al., 2015; HWANG et al., 2004). Hwang et al. (2004) afirmam que a produção de H₂ pela rota do etanol é favorável em valores de pH entre 4,5-5,0. Entretanto, no presente estudo, esse tipo de fermentação foi favorecida em valores de pH entre 2,8-3,3. Reforçando esses resultados, Mota et al. (2018) obtiveram uma fração de etanol correspondente a 27% da DQO total solúvel analisada em um pH abaixo de 3,0, concomitante com uma produção relevante de H₂. Melhores resultados de bioH₂ também foram observados juntamente com maiores concentrações de etanol em duas etapas diferentes no processamento de soro de queijo (Capítulo 9). Essa condição também foi observada neste estudo quando a sacarose foi o único substrato de alimentação (100S) (Figura 13).

Tabela 12 – Valores médios de grau de acidificação (%), rendimento (Y_{AO}) e produção (P_{OA}) de ácidos orgânicos e solventes em cada condição do U30 e U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.

Nomenclatura	100S	S75V25	S50V50	S25V75	V100DQO5	V100DQO10
Período (d)	1-56	57-66	67-79	80-86	86-103	104-114
S₀ (g L⁻¹)	5	5	5	5	5	10
Fração de S (%)	100	75	50	25	0	0
Fração de V (%)	0	25	50	75	100	100
Acidificação U30 (%)	47 ± 17	58 ± 15	54 ± 20	51 ± 24	40 ± 5	27 ± 9
Acidificação U55 (%)	17 ± 7	31 ± 7	45 ± 14	35 ± 7	28 ± 13	23 ± 1
Y_{AO} U30 (mg DQO_{AO} g⁻¹ DQO_{tar})	373 ± 135	443 ± 170	377 ± 181	456 ± 232	376 ± 52	259 ± 84
Y_{AO} U55 (mg DQO_{AO} g⁻¹ DQO_{tar})	98 ± 36	241 ± 69	291 ± 61	209 ± 24	248 ± 122	212 ± 12
P_{AO} U30 (mg DQO_{AO} L⁻¹ d⁻¹)	12996 ± 5377	14492 ± 5686	10765 ± 3793	16814 ± 8000	13286 ± 1556	17396 ± 5220
P_{OA} U55 (mg DQO_{AO} L⁻¹ d⁻¹)	3320 ± 1039	6469 ± 1798	8327 ± 3063	6327 ± 690	7703 ± 3453	14024 ± 1642

Fonte: Elaborada pela autora.

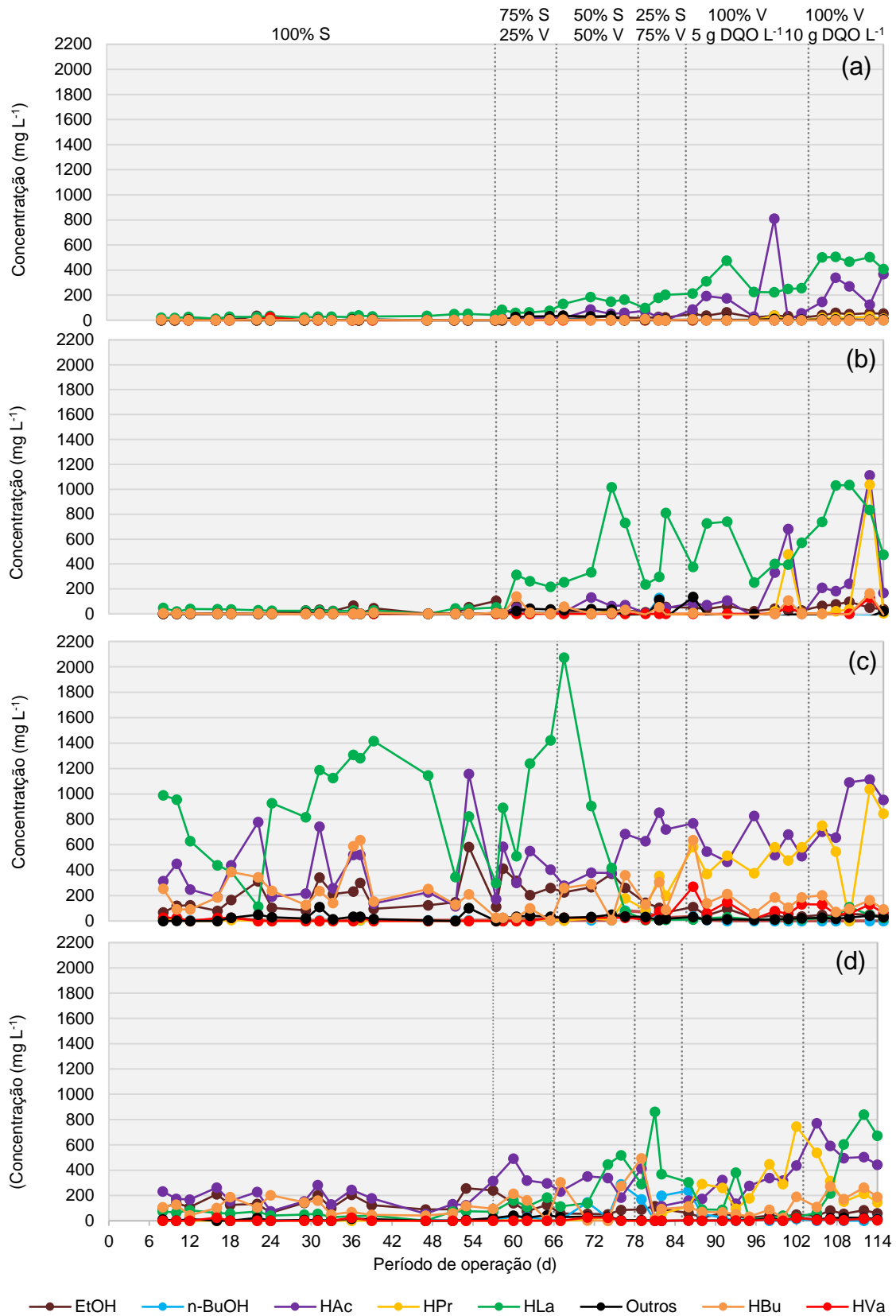
Síglas: S₀ – concentração inicial do substrato; S - sacarose; V – vinhaça diluída.

Diversos autores descrevem uma diminuição no HY concomitante com um aumento na concentração de ácido láctico (ARIMI et al., 2015; MOTA et al., 2018; SAADY, 2013). Bactérias do ácido láctico têm sido descritas como produtoras de bacteriocina (um peptídeo antimicrobiano), causando prejuízo na produção de H₂ devido à competição por substrato e substituição da fermentação de hidrogênio por ácido láctico e fermentação de etanol (SIKORA et al., 2013). De acordo com Fuess; Zaiat e Nascimento (2019), valores de pH baixos podem favorecer a inibição de bactérias consumidoras de lactato, levando ao predomínio de produtos do metabolismo das bactérias do ácido láctico, resultando em baixos níveis de produção de bioH₂ e o subsequente acúmulo de HLa no reator. No entanto, a fermentação do ácido láctico pode desempenhar um papel duplo, pois reduz a produção de bioH₂ devido à competição por substrato ou leva à produção de bioH₂ por meio da conversão de lactato em ácido butírico junto com H₂ (FUESS; GARCIA e ZAIAT, 2018; SIKORA et al., 2013). No estudo conduzido por Niz et al. (2019), em condições termofílicas extremas (70°C) para a produção de bioH₂ a partir da vinhaça da cana-de-açúcar, a via láctica/acética foi a principal rota para a produção de bioH₂.

Embora alta concentração de ácido láctico tenha sido observada no U30 quando também havia PVH e HY mais altos, esses resultados não indicam que a produção de ácido láctico foi benéfica para a produção de bioH₂. Nas condições específicas avaliadas neste estudo (pH abaixo de 3,0), a produção de bioH₂ a partir do lactato não ocorreu e o enriquecimento de bactérias lácticas foi associado a rendimentos reduzidos de H₂, conforme será discutido na próxima seção. No entanto, uma vez que o ácido láctico pode ser uma fonte de carbono para o alongamento da cadeia de AO, sua produção pode ser vantajosa (ENG SÁNCHEZ et al., 2021).

O espectro de ácidos obtidos também variou de acordo com as condições de temperatura de cada reator. Em geral, grandes proporções de ácido acético e propiônico foram obtidas em condições mesofílicas e de ácido láctico, acético, butírico e propiônico, em condições termofílicas.

Figura 14 – Concentração de metabólitos afluente ao (a) U30, (b) U55 e efluente ao (c) U30 e (d) U55 para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: EtOH – etanol; n-BuOH – n-butanol; HAC – ácido acético; HPr – ácido propiônico; HLa – ácido lático; HBr – ácido butírico; HVa – ácido valérico; S - sacarose; V – vinhaça diluída.

Independentemente da fração da vinhaça presente no substrato, o reator U30 apresentou melhor desempenho na produção de AO do que o reator U55, conforme pode ser verificado pelo grau de acidificação apresentado em todas as etapas de operação (Tabela 12). Esses resultados estão de acordo com os resultados descritos por Eng Sánchez et al. (2021) em seu estudo sobre a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato em fermentação escura para recuperação de metabólitos solúveis. Os autores também obtiveram rendimento maximizado ($401 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{t,af}}$) e produtividade ($653 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de AO em condição mesofílica/alcalina (40°C ; $\text{pH} = 8,8\text{-}10,0$). Considerando a operação com vinhaça como substrato, foi possível obter um rendimento de ácido orgânico de 376 ± 52 e $248 \pm 122 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{t,af}}$ para os reatores U30 e U55, respectivamente. Neste estudo, em relação à produtividade, os reatores U30 e U55 apresentaram valores respectivos de 17396 ± 5220 e $14024 \pm 1642 \text{ mg DQO}_{\text{AO}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ na condição S_0 de 10 g L^{-1} (V100DQO10), valores muito superiores ao resultado máximo relatado por Eng Sánchez et al. (2021). Também é muito importante ressaltar que esses resultados foram obtidos sem nenhum tipo de ajuste de pH e em uma faixa de pH de 4,1-4,8. Portanto, a economia obtida por não ser necessária a adição de alcalinizantes em um processo em escala real pode compensar o menor rendimento.

Os resultados de produção de AO obtidos neste estudo indicam que a fermentação acidogênica da vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH pode ser uma abordagem promissora para a valorização do tratamento desse efluente por meio da produção de AO e seu uso direto. Alternativamente, esses ácidos podem ser usados como uma fonte de carbono para outros produtos de interesse, como metano, biopolímeros (OLIVEIRA et al., 2019) ou ácidos graxos de cadeia média mais valiosos por meio do alongamento da cadeia.

Do ponto de vista prático e de custo-benefício, este estudo demonstrou grande potencial, visto que o efluente foi acidificado sem a necessidade de ajuste de pH e com exigências mínimas de operação. Produção de AO relevante pôde ser obtida quando apenas a vinhaça foi utilizada como substrato, além de alta produção de H_2 quando a sacarose foi utilizada como único substrato ou como cossubstrato. Embora a água residuária sintética à base de sacarose não possa ser considerada um substrato viável para uso em plantas em escala real, tais resultados estabeleceram precedentes para a produção de hidrogênio sem ajuste de pH a ser avaliado com outros substratos ricos em açúcar como, por exemplo, melaço de cana-de-açúcar, subproduto da cadeia produtiva do açúcar (FUESS et al., 2021; FUESS; ZAIAT e NASCIMENTO, 2020; 2021; OLIVEIRA et al., 2020; VILELA et al., 2021).

Vale também destacar que este estudo não exigiu: (i) qualquer tipo de ajuste de pH (por meio da adição de tampões ou recirculação do efluente), (ii) descarte de lodo durante a operação (visto que o sistema apresentou capacidade de autorregulação), (iii) tratamento químico ou térmico do lodo de inóculo, que foi constituído por um consórcio microbiano misto que tem como principais vantagens a tolerância a diversos fatores ambientais como pH, temperatura, flexibilidade de trabalhar com diversas composições de substrato sem necessidade de esterilização do meio. Todas essas vantagens mostram o potencial deste estudo para implementação em escala piloto. No entanto, é muito importante ressaltar que foi utilizada vinhaça diluída, o que não seria o ideal para uma implementação em escala real. Assim, o próximo passo para um estudo futuro a respeito da produção de AO é a utilização de vinhaça real *in natura* e sem diluição.

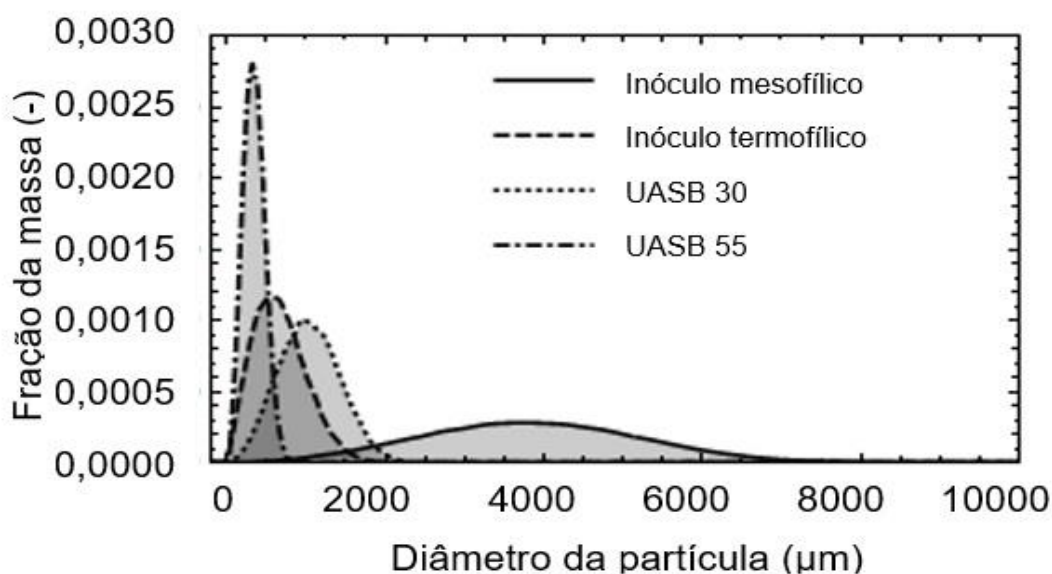
10.2.3 Estrutura e composição da comunidade microbiana

Na Figura 15 é possível observar como a biomassa mudou ao longo do estudo. A partir da distribuição de tamanho de Weibull, a faixa de diâmetros das partículas foi extraída nos percentis de 10% e 90%. O inóculo mesofílico utilizado no U30, no início do estudo, apresentava partículas de 2060-5610 μm de diâmetro e ao final do estudo, o lodo do U30 apresentou partículas de 545-1550 μm de diâmetro.

O inóculo termofílico utilizado no U55, no início do estudo, apresentava partículas com diâmetro de 260-1125 μm e ao final do estudo, o lodo do U55 apresentou partículas de 170-520 μm de diâmetro.

Diâmetros de partícula menores de grânulos nos reatores acidogênicos em comparação com seus respectivos inóculos podem ser uma indicação de enriquecimento da comunidade acidogênica, uma vez que as bactérias acidogênicas crescem principalmente em suspensão, em partículas menores (JEISON et al., 2008; JEISON; LIER, 2007). Mota (2019) também relatou diâmetros médios de partícula menores de lodo de um reator acidogênico em comparação com reatores metanogênicos de membrana. Os resultados microbiológicos obtidos neste estudo também corroboram com esse enriquecimento da comunidade acidogênica ao longo da operação. Além de diâmetros menores dos grânulos, uma faixa de lodo menor também pode ter contribuído, pois uma maior velocidade ascensional pode ter selecionado os microrganismos.

Figura 15 - Distribuição do tamanho de partícula da biomassa dos reatores U30 e U55 ao final da operação com vinhaça de cana-de-açúcar e seus respectivos inóculos em sua forma original³.

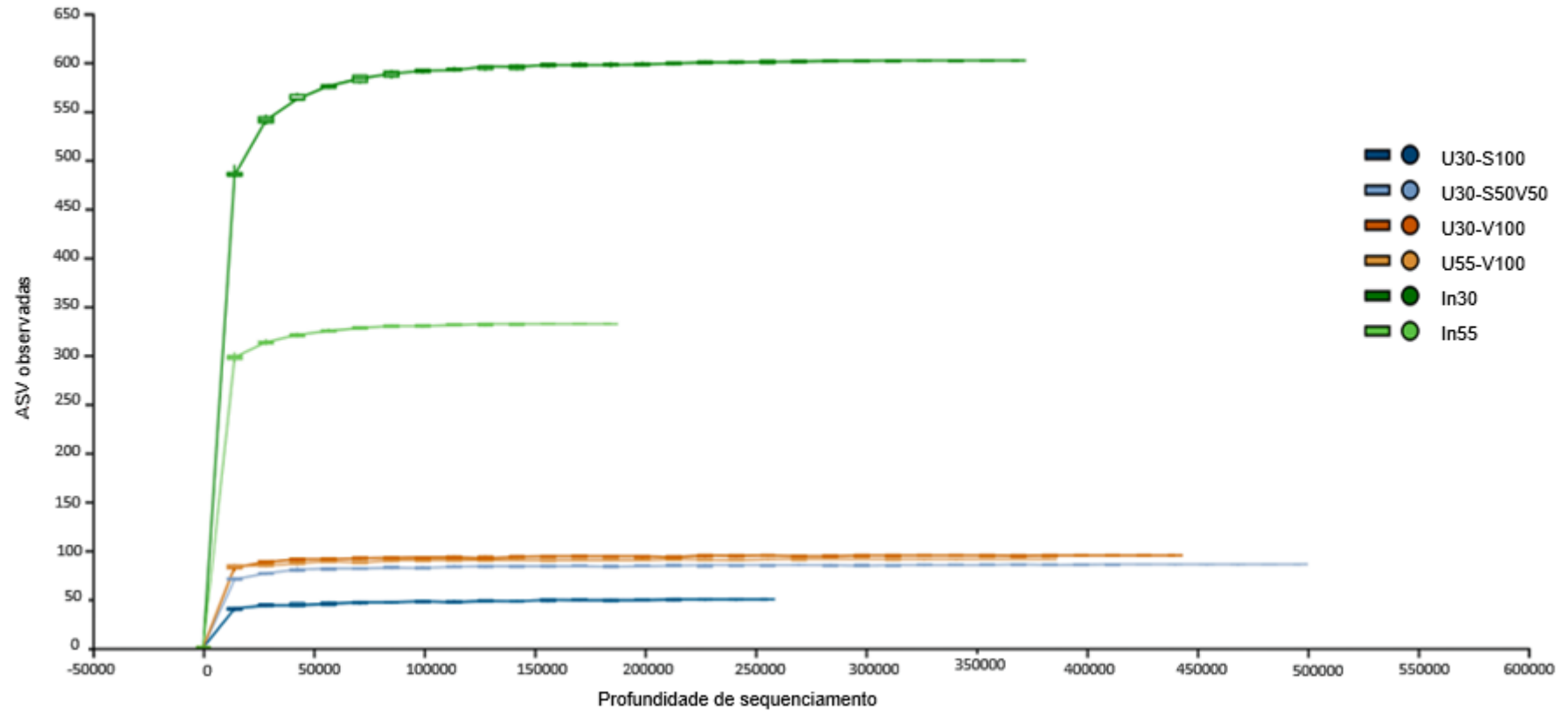


Fonte: Elaborada por Gustavo Cesar Dacanal e adaptada pela autora.

Foram obtidas 2.174.506 sequências, suficientes para cobrir a diversidade das amostras de inóculo e lodo (Figura 16). A caracterização da comunidade microbiana dos reatores em nível de gênero é ilustrada na Figura 17. A Tabela 13 mostra as *amplicon sequence variants* (ASV) prevalentes encontradas nos reatores e no inóculo. O microbioma do reator acidogênico diferia muito de seu respectivo inóculo. As ASV mais encontradas no inóculo não foram encontradas nos reatores (Tabela 13) e os organismos metanogênicos foram completamente inibidos em condições acidogênicas (Archaea representou menos de 0,01% do microbioma total nos reatores acidogênicos). Observou-se uma grande redução da diversidade, com valores do índice de Shannon do inóculo usado no U30 e U55 de 6,54 e 6,25, respectivamente. No entanto, quando o U30 foi alimentado com 100% de efluente à base de sacarose, o valor do índice de Shannon de sua amostra de lodo foi de 2,61.

³Antes do procedimento de inoculação em que os grânulos foram completamente rompidos por um liquidificador.

Figura 16 - Curva de rarefação baseada em contagens de sequência para processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Siglas: U30-S100, U30-S50V50, U30-V100: U30 alimentado com 100% de sacarose, 50% de sacarose e 50% de vinhaça diluída, e 100% de vinhaça diluída, respectivamente. U55100: U55 alimentado com 100% de vinhaça diluída. In30: inóculo utilizado no U30. In55: inóculo utilizado no U55.

Tabela 13 - ASV com abundância maior de 10% em no mínimo uma das amostras do processamento de vinhaça de cana-de-açúcar.

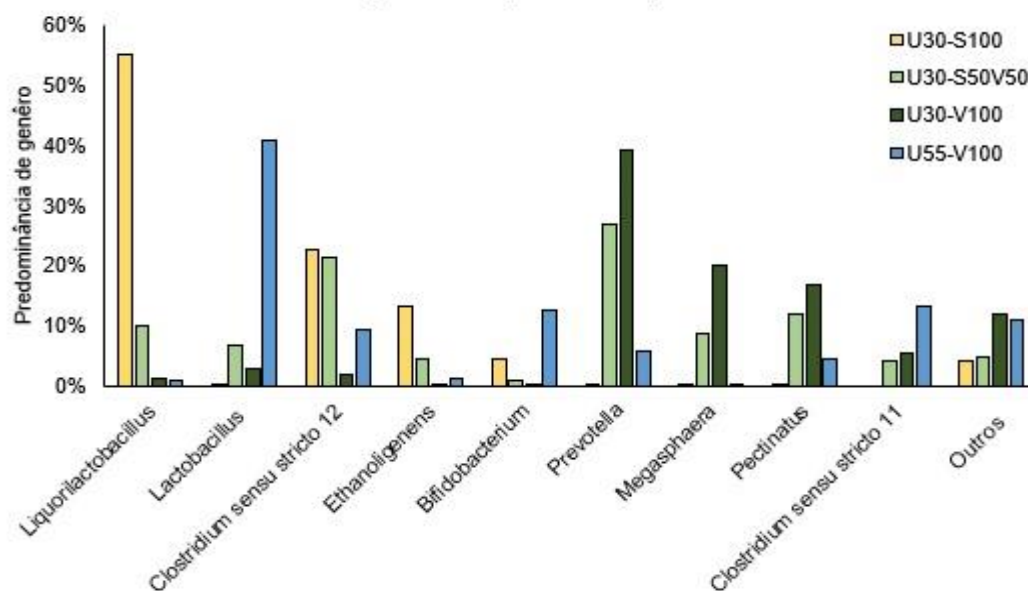
ASV	Domínio	Gênero	Espécie mais próxima	Confiança*	S30	SV30	V30	V55	In30	In55
001	Bacteria	<i>Prevotella</i>	sem cultura	1,000	0,1%	24,8%	34,1%	5,4%	0,0%	0,0%
002	Bacteria	<i>Liquorilactobacillus</i>	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	0,996	39,5%	7,6%	1,0%	0,7%	0,0%	0,0%
003	Bacteria	<i>Pectinatus</i>	-	1,000	0,0%	11,8%	16,8%	4,6%	0,0%	0,0%
004	Bacteria	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium acidisoli</i>	0,948	17,2%	14,8%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
005	Bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,999	0,0%	0,0%	0,0%	21,9%	0,0%	0,0%
006	Bacteria	<i>Megasphaera</i>	<i>Megasphaera sueciensis</i>	0,857	0,0%	6,1%	13,3%	0,4%	0,0%	0,0%
007	Bacteria	<i>Liquorilactobacillus</i>	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	0,999	15,6%	2,4%	0,4%	0,2%	0,0%	0,0%
008	Bacteria	<i>Ethanoligenens</i>	sem cultura	1,000	13,3%	4,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
009	Archaea	<i>Methanosaeta</i>	-	0,986	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	13,4%	0,0%
010	Bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	0,902	0,0%	0,0%	0,0%	12,2%	0,0%	0,0%
011	Bacteria	<i>Clostridium sensu stricto 12</i>	-	1,000	0,0%	2,8%	1,1%	7,2%	0,0%	0,0%
012	Bacteria	<i>Defluviitoga</i>	sem cultura	0,832	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	10,6%
013	Bacteria	<i>Lactobacillus</i>	-	1,000	0,0%	5,4%	2,4%	2,2%	0,0%	0,0%
014	Bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	1,000	0,0%	0,0%	0,0%	9,4%	0,0%	0,0%
015	Bacteria	<i>Coprothermobacter</i>	-	1,000	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8,4%
016	Bacteria	<i>Prevotella</i>	sem cultura	0,999	0,0%	2,1%	5,0%	0,5%	0,0%	0,0%
017	Bacteria	uncultured (f: Anaerolineaceae)	sem cultura	0,801	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,5%	0,0%
018	Bacteria	<i>Clostridium sensu stricto 11</i>	-	1,000	0,0%	0,0%	0,3%	6,5%	0,0%	0,0%
019	Bacteria	<i>Raoultella</i>	-	0,965	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Soma do percentil dos ASVs mais prevalentes					85,8%	82,4%	74,3%	71,2%	20,8%	19,0%

Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Siglas: S30, SV30, V30: U30 alimentado com 100% de sacarose, 50% de sacarose e 50% de vinhaça, e 100% de vinhaça, respectivamente. V55: U55 alimentado com 100% de vinhaça. In30: inóculo utilizado no U30. In55: inóculo utilizado no U55.

Nota: *Os valores de confiança são aqueles fornecidos para o último nível de taxonomia atribuído.

Figura 17 - Abundância relativa de gêneros prevalentes no U30 alimentado com efluente à base de 100% de sacarose (U30-S100), 50% de sacarose e 50% de vinhaça diluída (U30-S50V50) e 100% de vinhaça diluída (U30-V100), e no U55 alimentado com efluente à base de 100% vinhaça diluída (U55-V100).



Fonte: Elaborada por Vera Tainá Franco Vidal Mota.

Uma redução acentuada da diversidade microbiana, em comparação com o inóculo, em reatores alimentados com efluente à base de sacarose acompanhado por valores de pH extremamente baixos (<3,0) também foi observada no processamento de soro de queijo (Capítulo 9) e no estudo conduzido por Mota et al. (2018). Além disso, a produção de hidrogênio nessas condições foi associada à presença de bactérias relacionadas a *Ethanoligenens* e *Clostridium acidisoli* (esta espécie pertence a *Clostridium sensu stricto 12*), que também foram encontradas neste estudo (Figura 16, Tabela 13). Bactérias afiliadas a *Liquorilactobacillus nagelii*, encontradas principalmente no U30 na etapa operada com sacarose (100S), por outro lado, podem prejudicar a produção de H₂ em condições ácidas extremas devido ao seu metabolismo homofermentativo (ZHENG et al., 2020), que está de acordo com a alta produção de lactato nesta fase (Figura 14a e 14c). No momento de maior produção de H₂, correspondendo ao 37º dia de operação, que foi quando as amostras de lodo foram coletadas para análises moleculares (amplicon do gene 16S rRNA, metagenômica e metatranscriptômica), as análises metatranscriptômicas revelaram que bactérias relacionadas a *Ethanoligenens* e *Clostridium acidisoli* estavam mais ativas do que bactérias afiliadas a *L. nagelii* (MOTA et al., [s.d.]).

À medida que a vinhaça foi adicionada ao substrato, a diversidade microbiana aumentou; os valores do índice de Shannon foram 3,87, 3,59 e 4,33 para o U30 alimentado com

sacarose e vinhaça, apenas com vinhaça e para o U55 alimentado apenas com vinhaça, respectivamente. *Prevotella*, *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Clostridium sensu stricto 11* e *Lactobacillus* tornaram-se predominantes. Essas bactérias foram relatadas em vários estudos utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, tanto em condições mesofílicas (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE e ZAIAT, 2015b; LAZARO et al., 2014; REIS et al., 2015) quanto em condições termofílicas (FUESS; GARCIA e ZAIAT, 2018; NIZ et al., 2019). Além desses gêneros, no U55 alimentado apenas com vinhaça, *Bifidobacterium* também foi encontrada relativamente em grande proporção (Figura 17). Cassman et al. (2018) encontraram *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* entre os principais gêneros na vinhaça de cana-de-açúcar *in natura*, sugerindo que o microbioma dos reatores poderia ter sido alterado em parte devido às bactérias da própria vinhaça.

A metatranscriptômica revelou que *Pectinatus frisingensis* era a bactéria mais ativa ao final da operação (114º dia) no U30, correlacionando-se com a alta produção de propionato (Figura 14a e 14c), enquanto a produção de acetato e butirato da vinhaça foi atribuída principalmente a *Megasphaera* e *Clostridium* (MOTA et al., [s.d.]). No U55, a alta abundância de bactérias afiliadas a *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus amylolyticus* e *Bifidobacterium thermophilum*, que são bactérias de ácido láctico termofílicas (BOHAK et al., 1998; GRATTEPANCHE; LACROIX, 2013), sugere sua correlação com a alta produção de lactato da vinhaça (Figura 14b e 14d). Os resultados das análises metatranscriptômicas também mostraram que *Pectinatus* e *Prevotella* foram responsáveis pelo consumo de glicerol e reações de degradação inicial (MOTA et al., [s.d.]). A maior abundância dessas bactérias no U30 em comparação com o U55 poderia explicar a melhor remoção de glicerol da vinhaça sob condições mesofílicas (Tabela 11).

A produção bem-sucedida de bioH₂ obtida em pH abaixo de 3,0 usando efluente à base de sacarose não se sustentou quando um substrato mais complexo foi usado como alimentação e o pH aumentou naturalmente para valores acima de 4,0, assim como foi observado na fermentação de soro de queijo sem ajuste de pH (Capítulo 9). Isso pode ser atribuído à mudança na comunidade microbiana de bactérias não homoacetogênicas e produtoras de hidrogênio (relacionadas a *Etanoligenens* e *C. acidisoli*) para produtoras de propionato (*Pectinatus*), produtoras de lactato (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e outras bactérias não hidrogenogênicas (*Megasphaera* e *Prevotella*), bem como bactérias homoacetogênicas potenciais (dentro do gênero *Clostridium*). Também é importante ressaltar que, à medida que a fração da vinhaça na alimentação aumentava, alguns compostos fenólicos críticos, como o fenol e as melonoidinas,

também aumentavam. Esses compostos apresentam características antioxidantes, e sua presença pode gerar toxicidade às populações microbianas em reatores biológicos científicos no tratamento da vinhaça e reduzir ou mesmo inibir a atividade microbiana no solo e/ou ambientes aquáticos (FUESS e GARCIA, 2014).

10.3 Comparação do processamento do soro de queijo com o processamento da vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH: conclusões gerais

Conforme a sacarose foi substituída gradativamente por substratos mais complexos (soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar) houve uma queda na produção de bioH₂ concomitante e proporcional à fração destes substratos na alimentação. Diante dos resultados obtidos, acredita-se que um pH abaixo de 3,0 é crucial para que a produção de bioH₂ ocorra sem a adição de alcalinizantes no sistema. É importante destacar que por serem substratos complexos, o soro e principalmente a vinhaça possuem alguns componentes críticos para a produção de H₂ em sua composição (alta concentração de proteínas, fenol, sulfato e melanoidinas), no entanto, acredita-se que este não foi o principal fator limitante para a produção de H₂ devido ao fato de que diversos estudos relatam a produção de bioH₂ por meio da fermentação escura destes substratos. Conforme a sacarose era substituída tanto por soro quanto por vinhaça também houve um aumento no pH de valores abaixo de 3,0 para valores acima de 3,5 em todos os reatores avaliados, o que corrobora tais conclusões.

Em relação aos metabólitos solúveis, pode-se afirmar que uma concentração considerável de ácido acético, láctico e etanol foi observada em todos os reatores operados com sacarose na condição mesofílica, em ambos os estudos. O reator UASB operado no processamento da vinhaça com sacarose em condição termofílica (U55) apresentou uma concentração mais baixa de todos os AO e solventes. Conforme a sacarose foi substituída pelo soro ou pela vinhaça, os principais metabólitos observados em ambos os estudos foram o ácido acético, butírico e propiônico. O reator UASB operado com vinhaça em condição termofílica (U55) não produziu ácido láctico, no entanto, o ácido valérico foi observado apenas neste reator. Os reatores operados com soro de queijo apresentaram maior concentração de etanol, já os reatores operados com vinhaça de cana-de-açúcar apresentaram uma concentração quase nula deste metabólito. Uma concentração de AO e solventes muito mais alta foi obtida para os reatores operados apenas com soro de queijo, sem adaptação da biomassa (Etapa 2 – So) e os principais ácidos produzidos foram o ácido acético e principalmente o ácido láctico, no entanto,

é importante destacar que COVs mais altas também foram utilizadas para estes reatores. Ambos os substratos apresentaram potencial para a produção de AO e solventes com um grau de acidificação médio ao redor de 40%, com exceção do reator UASB (U55) avaliado com vinhaça em condição termofílica que apresentou resultados inferiores, ao redor de 25%.

Uma diferença na comunidade microbiana foi observada de forma similar nos dois estudos. De modo geral, foram observados microrganismos produtores de H₂ para todos os reatores alimentados com sacarose e microrganismos não produtores para todos os reatores alimentados com soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar. Os principais produtores de hidrogênio encontrados em ambos os estudos foram bactérias afiliadas a *Ethanoligenens* e *Clostridium* sensu stricto 12. Os reatores alimentados com soro de queijo apresentaram uma alta abundância de não produtores de H₂ tais como *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Selenomonas*, no entanto, a alimentação inicial com sacarose empregada na Etapa 3 – S (adaptação) + So (operação) reduziu a presença de *Lactobacillus* ao final da operação quando comparado à Etapa 2 – So, na qual apenas o soro foi utilizado como substrato. Os microrganismos *Prevotella* e *Lactobacillus* também foram encontrados nos reatores alimentados com vinhaça, além de *Megasphaera*, *Pectinatus* e *Clostridium* sensu stricto 11.

Resumidamente, pode-se afirmar que melhor desempenho na produção de H₂ foi obtido para o reator UASB operado em condição mesofílica com sacarose em uma condição de pH abaixo de 3,0. Maior diversidade de AO e solventes foi observada para os reatores operados com substratos complexos (soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar) nos quais foi empregada a estratégia de adaptação da biomassa com sacarose. Os reatores operados apenas com soro de queijo, sem adaptação de biomassa apresentaram uma menor diversidade de AO, porém altas concentrações de ácido acético e principalmente ácido láctico foram obtidas. Além de um aumento natural do pH conforme a sacarose era substituída pelos outros substratos (soro e vinhaça) também foi observada uma clara mudança na comunidade microbiana de microrganismos produtores de H₂ para microrganismos não produtores.

10.4 Conclusões

A novidade deste estudo reside no fato de que foi possível obter produtos de interesse mesmo sem a adição de alcalinizantes ou qualquer outro tipo de controle de pH, e uma vez que a fermentação escura geralmente é estudada sob valores de pH mais elevados do que a faixa observada neste estudo isso é muito vantajoso. Uma alta PVH foi obtida durante a fase de

alimentação com sacarose com respectivos valores médios de 3174 ± 961 e 1124 ± 634 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ para o U30 e o U55. Já a aplicação de vinhaça afetou negativamente a produção de H₂ em baixos pHs. Um efeito positivo foi observado para a produção de ácidos orgânicos, resultando em uma boa acidificação do efluente, com rendimentos médios de 376 ± 52 e 248 ± 122 mg DQO_{AO} g⁻¹ DQO_{taf}, e produtividade de 17396 ± 5220 e 14024 ± 1642 mg DQO_{AO} L⁻¹ d⁻¹, para o U30 e o U55, respectivamente. Um pH abaixo de 3,0 pareceu ser um fator crucial para a produção de bioH₂ sem ajuste de pH, uma vez que foi observada uma mudança na estrutura da comunidade microbiana. Quando a sacarose foi usada (pH <3,0), *Etanoligenens*, *Clostridium sensu stricto 12* e *Liquorilactobacillus* estavam presentes. Por outro lado, quando se utilizou vinhaça (pH > 4,0), foram encontrados *Prevotella*, *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Clostridium sensu stricto 11* e *Lactobacillus*. Um alto grau de conversão de carboidratos e glicerol, concomitante a uma produção relevante de ácidos orgânicos foi observado quando apenas a vinhaça era o substrato de alimentação. Tais resultados mostram que a estratégia de alimentar inicialmente os reatores com água residuária à base de sacarose, é promissora para efluentes reais. Esta estratégia favoreceu um microbioma adequado para a obtenção de produtos de valor agregado a partir da vinhaça da cana-de-açúcar, sem a necessidade de qualquer adição de tamponamento ou pré-tratamento do lodo.

11 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO ESCURA DE ÁGUA RESIDUÁRIA RICA EM PROTEÍNA: EFLUENTE DO COZIMENTO DE ATUM EM CONSERVA⁴

Este estudo teve como objetivos específicos (i) avaliar o potencial de produção de ácidos orgânicos (AO) a partir da fermentação de cultura anaeróbia mista em um reator de mistura de um substrato real rico em proteína: água residuária de cozimento de atum em conserva (ARCAC); (ii) analisar diferentes estratégias/rotinas operacionais para maior produção de AO; (iii) buscar seletividade direcionando a produção de AO a produtos desejados por meio de estratégias operacionais adequadas e (vi) ajudar a suprir uma lacuna atual existente de conhecimento científico relativo à produção de AO a partir da degradação de proteínas em processos de fermentação escura usando culturas mistas de microrganismos.

11.2 Material e métodos

11.2.1 Caracterização do substrato

O substrato escolhido para este estudo foi uma água residuária de cozimento de atum da fábrica de conservas Atunlo, localizada em O Grove, Espanha. O efluente foi coletado diretamente de um tanque de armazenamento, homogeneizado a 65-70 °C após passar por um processo físico (flotação) de retirada de gordura. Na data da coleta, o principal tipo de atum processado era o Listado. A caracterização completa do substrato, incluindo a composição de aminoácidos (AA), é apresentada respectivamente na Figura 18 e na Tabela 14.

⁴Esta etapa do trabalho encontra-se presente no artigo Exploring the valorization of wastewater from canning industry into volatile fatty acids by anaerobic mixed culture fermentation (em elaboração).

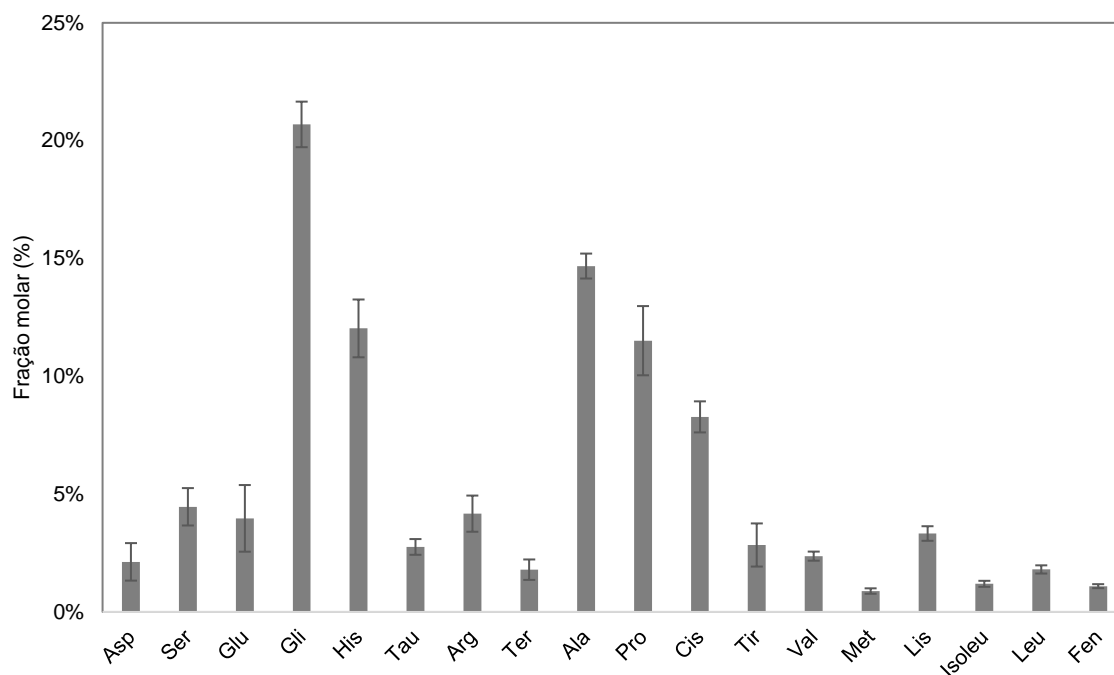
Tabela 14 – Caracterização do efluente de cozimento de atum em conserva.

Parâmetros	Média	±
pH	6,13	0,05
Condutividade (mS cm⁻¹)	15,63	2,32
DQO total (g L⁻¹)	15,08	0,18
DQO solúvel (g L⁻¹)	13,28	0,20
Amônio (mg N-NH₄⁺ L⁻¹)	186,77	103,20
SST (g L⁻¹)	1,32	0,02
SSF (g L⁻¹)	0,00	0,00
SSV (g L⁻¹)	1,32	0,02
ST (g L⁻¹)	21,20	0,55
SFT (g L⁻¹)	9,56	0,61
SVT (g L⁻¹)	11,65	0,78
Proteínas totais (g L⁻¹)	7,59	0,29
Carboidratos totais (mg L⁻¹)	94,38	20,14
NTK (g L⁻¹)	3,01	0,01
Ácido acético (g L⁻¹)	0,39	0,05
Ácido propiônico (g L⁻¹)	0,08	0,02
Ácido isobutírico (g L⁻¹)	0,03	0,01
Ácido butírico (g L⁻¹)	0,06	0,02
Ácido isovalérico (g L⁻¹)	0,03	0,01
Ácido valérico (g L⁻¹)	0,00	0,00
Ácido isocapróico (g L⁻¹)	0,07	0,01
Ácido caprúico (g L⁻¹)	0,00	0,00
Ácido n-heptanóico (g L⁻¹)	0,00	0,00
Li⁺ (mg L⁻¹)	0,00	0,00
Na⁺ (mg L⁻¹)	2571,75	269,11
K⁺ (mg L⁻¹)	344,58	181,88
Mg²⁺ (mg L⁻¹)	756,89	25,67
Ca²⁺ (mg L⁻¹)	87,45	22,33
Cl⁻ (mg L⁻¹)	49,47	20,20
NO₂⁻ (mg L⁻¹)	4271,97	140,01
Br⁻ (mg L⁻¹)	0,00	0,00
NO₃⁻ (mg L⁻¹)	10,13	2,82
PO₄³⁻ (mg L⁻¹)	0,00	0,00
SO₄²⁻ (mg L⁻¹)	855,33	63,20
Glicose (g L⁻¹)	111,24	6,49
Glicerol (g L⁻¹)	0,00	0,00
Ácido láctico (g L⁻¹)	2,10	0,06
Ácido fórmico (g L⁻¹)	0,00	0,00
Etanol (g L⁻¹)	0,00	0,00
Salinidade (g NaCl L⁻¹)	7,00 – 9,50	0,00

Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: DQO – demanda química de oxigênio; SSF- sólidos em suspensão fixos; SST - sólidos em suspensão totais; SSV - sólidos em suspensão voláteis; ST- sólidos totais; SFT- sólidos fixos totais; SVT - sólidos voláteis totais.

Figura 18 - Composição de aminoácidos da água residuária de cozimento de atum em conserva.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: Asp – Ácido Aspártico; Ser - Serina; Glu – Ácido Glutâmico; Gli - Glicina; His - Histidina; Tau - Taurina; Arg - Arginina; Tre – Treonina; Ala - Alanina; Pro - Prolina; Cis - Cisteína; Tir - Tirosina; Val - Valina; Met - Metionina; Lis - Lisina; Isoleu - Isoleucina; Leu - Leucina; Fen - Fenilalanina.

Como esperado, foram encontradas grandes frações dos AA glicina, prolina e alanina, AA que compõem o colágeno (Figura 18), uma das principais proteínas animais que está em alta concentração no atum. O substrato apresentou DQO total de $15,08 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$, alta concentração de ácido láctico de $2,10 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ e era composto praticamente apenas por proteína ($7,59 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$). Sua concentração de carboidratos totais era extremamente baixa ($94,38 \pm 20,14 \text{ mg L}^{-1}$) e o efluente passou por um processo de pré-tratamento para a retirada de gordura. A concentração medida de NTK de $3,01 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ confirma a alta concentração de proteína. O substrato também possuía uma salinidade considerável de $7,00 - 9,50 \text{ g NaCl L}^{-1}$ (Tabela 14).

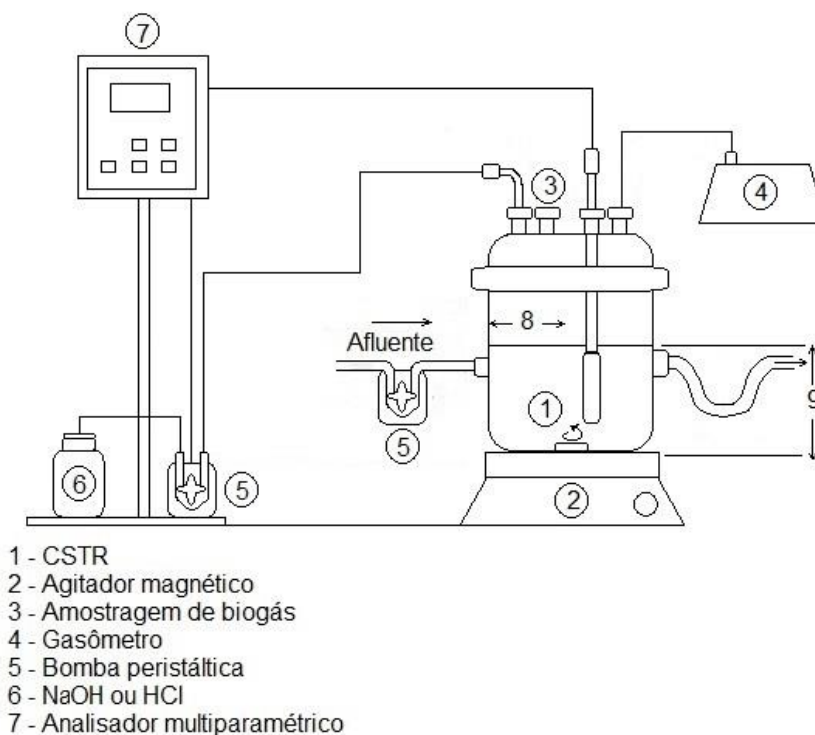
Um teste de potencial bioquímico de metano (PBM – *Biomethane Potential*) foi realizado para este substrato conforme protocolo descrito por Holliger et al. (2016). Foram utilizados frascos de 0,5 L de volume total (0,375 L de volume de trabalho) com rolhas de borracha. Os frascos foram previamente inoculados com biomassa anaeróbia de um reator mesofílico alimentado com lodo de esgoto. Os volumes foram selecionados de acordo com as concentrações de SVT presentes no inóculo ($10,5 \text{ g SVT L}^{-1}$) e substrato (11 g SVT L^{-1}) a fim de atingir razões inóculo-substrato (ISR - *inoculum to substrate ratio*) não inibitórias de 2 e 4.

Um ensaio em branco (somente inóculo) também foi incluído para monitorar a produção de biogás residual do inóculo. Os testes foram conduzidos por triplicatas a 37,5°C em um agitador orbital por 16 dias. Produção e composição do biogás foram monitoradas diariamente.

11.2.2 Configuração do experimento, condições operacionais e procedimento de inoculação

Um reator de mistura alimentado com ARCAC com um volume útil de 1 L foi operado durante 281 dias sob condição mesofílica (37±1 °C). Um analisador multiparamétrico (CHEMITEC, Itália), conectado a sondas Hamilton, foi usado para monitorar continuamente o pH e controlá-lo por meio da adição de HCl (6 M) ou NaOH (0,25 M). A mistura da fase líquida foi fornecida por agitadores magnéticos ajustados a aproximadamente 200 rpm (Figura 19).

Figura 19 - Diagrama esquemático do reator de mistura utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.



*Medidas em cm

Fonte: Elaborada pela autora.

Várias condições de operação foram analisadas para a obtenção de melhores resultados de acidificação deste tipo de efluente e cada etapa é apresentada de forma resumida na Tabela 15 com suas respectivas condições operacionais.

Com base no estudo de Regueira et al. (2019), o pH foi inicialmente estabelecido em 7,0 com o intuito de promover maior conversão do substrato e conseqüentemente, maior produção de AO. Nas etapas seguintes, o pH foi baixado para 5,5 e 4,5 respectivamente para que a produção de AO pudesse ser dirigida a ácido butírico e conseqüentemente ácido capróico, já que a ARCAC apresentou alta concentração de ácido láctico em sua caracterização. Além do rendimento de n-butirato poder triplicar quando o pH muda de 6,0 a 4,5 (REGUEIRA et al., 2019), o lactato é um composto reduzido, rico em energia, que pode fornecer o acetil-CoA necessário para a produção de butirato por meio do alongamento da cadeia e as enzimas que catalisam a produção de butirato têm função na hexanoil-CoA para a formação de caproato (ANGENENT et al., 2016; ZHU et al., 2015). Valores de pH acima de 7,0 não foram avaliados neste estudo pois Bevilacqua et al. (2021) observaram que a conversão da gelatina foi fortemente prejudicada em pH 9,0 (<20%), e a gelatina apresenta composição de AA semelhante ao substrato utilizado neste estudo.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi inicialmente estabelecido em 4 dias correspondendo a uma carga orgânica volumétrica (COV) de 3,75 g DQO L⁻¹ d⁻¹. para que não houvesse sobrecarga do sistema, causando prejuízo na degradação das proteínas, que são o principal componente do substrato avaliado. Na próxima etapa o TDH foi baixado para 3 dias correspondendo a uma COV 5 g DQO L⁻¹ d⁻¹. TDHs abaixo de 3 dias não foram avaliados devido ao fato de que a fermentação de proteínas parece ser particularmente afetada por baixos TDHs, pois a hidrólise consiste em uma etapa limitante do processo (KHANAL, 2008). A faixa de TDH e COV deste estudo foi estabelecida visando promover a inibição e eliminação da biomassa metanogênica que pode prevalecer em baixas COVs e altos TDHs levando a uma perda parcial dos AO produzidos devido à metanização. Tais condições também foram estabelecidas para favorecer o desenvolvimento de uma comunidade microbiana apenas acidogênica.

Tabela 15 – Etapas do estudo conduzido com água residuária de cozimento de atum em conserva e suas respectivas condições operacionais.

Etapas	Período (d)	pH	TDH (d)	COV (g DQO L⁻¹ d⁻¹)
1	1-67	7	4	3,75
2	69-183	7	3	5
3	182-242	5,5	3	5
4	243-281	4,5	3	5

Fonte: Elaborada pela autora.

O procedimento de inoculação foi conduzido com 500 mL de efluente de um reator de mistura alimentado com efluente sintético à base de proteína com sal adicionado em uma concentração de 20 g L⁻¹ junto com 500 mL de efluente de um reator anaeróbio tratando efluente de atum enlatado com mexilhões, totalizando uma mistura de 1 L com concentração aproximada de 1,32 g SSV L⁻¹. O inóculo foi selecionado pelo fato de ambos os reatores possuírem biomassa adaptada a efluentes com alta concentração de proteínas e alta salinidade e ter como um dos principais objetivos a produção de AO.

11.2.3 Métodos analíticos

As concentrações de Nitrogênio Amônio Total (NAT) e AO foram determinadas duas vezes por semana para o efluente e uma vez por semana para o afluente, enquanto a DQO total e solúvel, concentrações de sólidos, ácido fórmico, ácido láctico, glicose, glicerol e o etanol foram medidos uma vez por semana para ambos os pontos.

Os parâmetros físico-químicos convencionais foram determinados de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012). Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas com um Shimadzu UV-1800. Os AO foram medidos por cromatografia gasosa (método AGV-DB1). O equipamento utilizado foi um Agilent 6850 com detector de ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi uma DB-Wax, da Agilent Technologies (30 m x 0,250 mm x 0,25 mm). O injetor tinha uma temperatura de 200 °C enquanto o detector foi ajustado para 300 °C. O gás de arraste era o nitrogênio. Ácido fórmico, ácido láctico, glicose, glicerol e etanol foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (método GLEFG1) com um HP 1100 equipado com um detector IR HP1047A. A coluna usada como um AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm) usando H₂SO₄ (5 mM) como um eluente isocrático. A temperatura definida para a coluna foi de 30°C, enquanto para o detector foi de 35°C. A composição do gás foi determinada por cromatografia gasosa com um HP 5890 Series II. Seringas de gás de 1 mL foram utilizadas para extrair as amostras gasosas através de septos de borracha de silicone fixados nos tubos de saída de gás dos reatores. Para a determinação de aminoácidos (AA) total, as amostras foram submetidas à hidrólise ácida por 24 h a 110 °C usando HCl 6 N. Em seguida, o método AccQ-Tag foi usado para convertê-las em derivados fluorescentes estáveis (COHEN; DEANTONIS e MICHAUD, 1993) que foram finalmente analisados por HPLC Waters 2695 equipado com um detector de fluorescência (Waters 2475).

11.2.4 Cálculos

O balanço de matéria orgânica (em g L⁻¹) foi calculado pela Eq. 13.

$$DQO_{af} = DQO_{AO} + DQO_{outrosPSF} + DQO_{SSV} + DQO_{biogás} + DQO_{sol} \quad \text{Eq. 13}$$

Em que DQO_{af} é a DQO total no fluxo de alimentação; DQO_{AO} representa a DQO total equivalente de AO; $DQO_{outrosPSF}$ representa a DQO equivalente de outros produtos solúveis da fermentação tais como etanol e ácido láctico; DQO_{SSV} é a DQO equivalente da biomassa de lavagem (1,42 g DQO g SSV⁻¹); $DQO_{biogás}$ representa a DQO equivalente à produção de biogás que foi determinada por meio de cálculos estequiométricos e da diferença de DQO afluenta e efluente ao reator; e DQO_{sol} representa a DQO solúvel não convertida (DQO recalitrante).

O grau de acidificação e amonificação (%) dos reatores foram calculados com base nas respectivas equações seguintes (Eq. 14 e 15).

$$\text{Grau de acidificação (\%)} = \frac{\sum DQO_{AO}}{DQO_{af}} \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

$$\text{Grau de amonificação (\%)} = \frac{C_{NATefl} - C_{NATaf}}{C_{NATmáxima}} \times 100 \quad \text{Eq. 15}$$

Em que C_{NATaf} é a concentração de nitrogênio amônio (mg N-NH₄⁺ L⁻¹) medido na alimentação do reator. C_{NATefl} é a concentração de nitrogênio amônio (mg N-NH₄⁺ L⁻¹) medida no efluente do reator e $C_{NATmáxima}$ é a concentração máxima de nitrogênio amônio (mg N-NH₄⁺ L⁻¹) alcançada se a degradação completa das proteínas ocorresse. A $C_{NATmáxima}$ foi estimada baseada na medida de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) na alimentação do reator.

O potencial bioquímico metano (PBM) foi calculado com base na Eq. 16

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{DQO_{CH_4}}{DQO_{substrato}} \quad \text{Eq. 16}$$

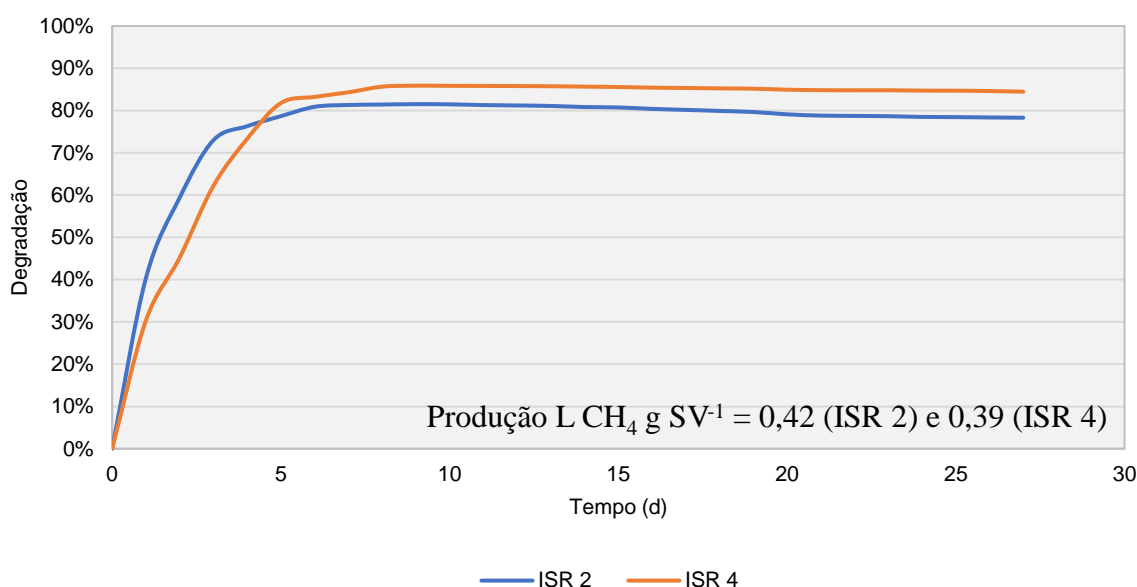
Em que DQO_{CH_4} corresponde ao metano produzido e $DQO_{substrato}$ à concentração de substrato adicionado aos ensaios, ambos em termos de DQO.

11.3 Resultados e discussões

11.3.1 Teste de potencial bioquímico de metano (PBM)

Os resultados do teste de potencial bioquímico de metano (PBM) são apresentados na Figura 20. Os resultados médios de uma degradação de 86% para uma ISR de 2 e 81% para uma ISR de 4, indicaram uma alta biodegradabilidade e alto potencial para a produção de AO.

Figura 20 – Resultados do teste de potencial bioquímico de metano (PBM) para a água residuária de cozimento de atum em conserva.



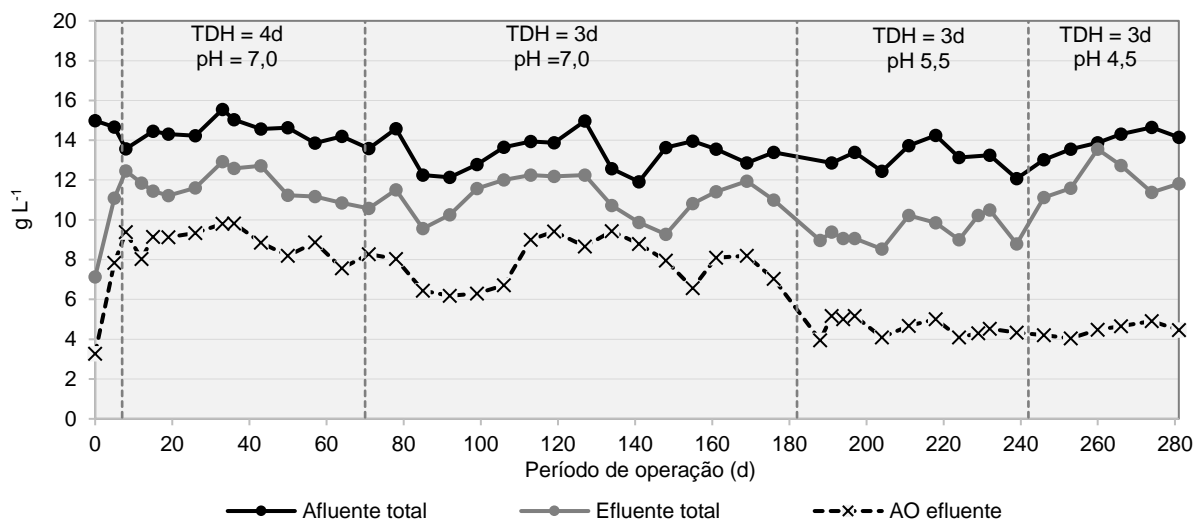
Fonte: Elaborada pela autora.

11.3.2 Operação do reator

A concentração de biomassa apresentou-se constante em todas as etapas do estudo com um valor de 1,3 g SSV L⁻¹, tanto na entrada quanto na saída do reator. Tais valores apresentaram-se abaixo dos valores relatados por Omil; Méndez e Lema (1996), uma concentração de 3,6 g SSV L⁻¹ para efluente de cozimento de atum, no entanto foram próximos aos valores apresentados por Veiga; Méndez e Lema (1994), uma faixa de 1,0-0,3 g SSV L⁻¹ para o mesmo tipo de efluente. Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) obtiveram o maior rendimento de ácidos graxos voláteis (AGV) para o ensaio com a menor porcentagem de sólidos. Segundo os autores uma alta concentração de AGV (47,80 g DQO L⁻¹) nos ensaios com maior concentração de sólidos totais pode ter inibido o processo acidogênico. Durante o processo de digestão anaeróbia, os resíduos sólidos são transformados em compostos orgânicos solúveis (DQOs), que consistem em AGV e em menor extensão em outros compostos de baixo peso molecular. Portanto, a baixa concentração de SSV observada ao longo de toda a operação

pode ter contribuído para a obtenção dos altos valores de acidificação que serão apresentados logo a seguir.

Figura 21 – Valores de DQO no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva⁵.



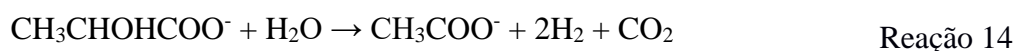
Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: TDH – tempo de detenção hidráulica; AO – ácidos orgânicos.

Com respeito ao balanço de massa global (BMG), a relação entre a DQO total estimada e a DQO total medida levou a um valor médio de 81%. Na primeira etapa, quando o TDH era de 4 dias, a metanização foi confirmada pela análise da composição do gás do volume do *headspace* do reator, o que pode explicar parte da “perda” de DQO observada na primeira etapa. A partir do momento em que o TDH foi reduzido para 3 dias, nenhuma concentração de metano ou H₂ foi detectada. Ainda sim, essa “perda” de DQO pode ser atribuída à produção de CO₂ que foi detectado ao longo de toda a operação em concentrações variando de 12-35% e também existe a hipótese de que pode ter havido produção de H₂. A produção de H₂ é prevista em reatores acidogênicos e foi estimada neste estudo por meio de cálculos estequiométricos do balanço de DQO entre o substrato de alimentação e produtos presentes no efluente, e apesar deste não ter sido detectado no *headspace* poderia estar solubilizado no efluente. A concentração considerável de ácido láctico no substrato de alimentação também corrobora com a hipótese de produção de H₂, uma vez que há uma via na qual ocorre a oxidação anaeróbia de lactato em acetato, H₂ e CO₂, que leva à síntese de ATP (Reação 14) (ZHU et al., 2015). É

⁵A primeira linha pontilhada separa o período de adaptação do reator durante a inoculação do restante da operação

importante também destacar que cerca de 10% da DQO consumida pode ser atribuída a crescimento de biomassa. Outros autores também observaram esta “perda” de DQO de cerca de 20% ou até mais em reatores acidogênicos operados com águas residuárias reais. Fuess et al. (2016) relataram um valor médio de BMG de 83% enquanto Ferraz Júnior et al. (2014) e Ferraz Júnior; Etchebehere; Zaiat (2015a) obtiveram valores de 66–79%.



11.3.3 Influência do TDH e pH no grau de acidificação e amonificação

O reator apresentou grau de amonificação médio de $64 \pm 5\%$ e grau de acidificação de $63 \pm 7\%$ para a primeira etapa (Figura 22), quando o TDH era de 4 dias. Na segunda etapa, quando o TDH foi reduzido para 3 dias, o grau médio de amonificação caiu para $58 \pm 6\%$ e o grau de acidificação para $55 \pm 6\%$. Esses resultados foram extremamente positivos, uma vez que Bevilacqua et al. (2020) obtiveram um grau máximo de acidificação de 40% em um reator contínuo operado com gelatina, um substrato com composição de AA semelhante ao utilizado neste estudo. Em contrapartida, dados da literatura indicam maior acidificação da gelatina (50 – 78 %) independentemente do TDH aplicado (BREURE; MOOIJMAN e VAN ANDEL, 1986; BREURE e VAN ANDEL, 1984; YU; FANG, 2003). Kim et al. (2020) relataram uma remoção média de 91,3% de proteína da gelatina a partir da acidogênese. Esta diferença nas eficiências de conversão observada por Bevilacqua et al. (2020) foi atribuída a uma série de fatores (por exemplo, composição da proteína, tipo de inóculo), e principalmente à falta de alguns micronutrientes, o que não foi um problema neste estudo, já que um efluente real, rico em nutrientes, foi utilizado.

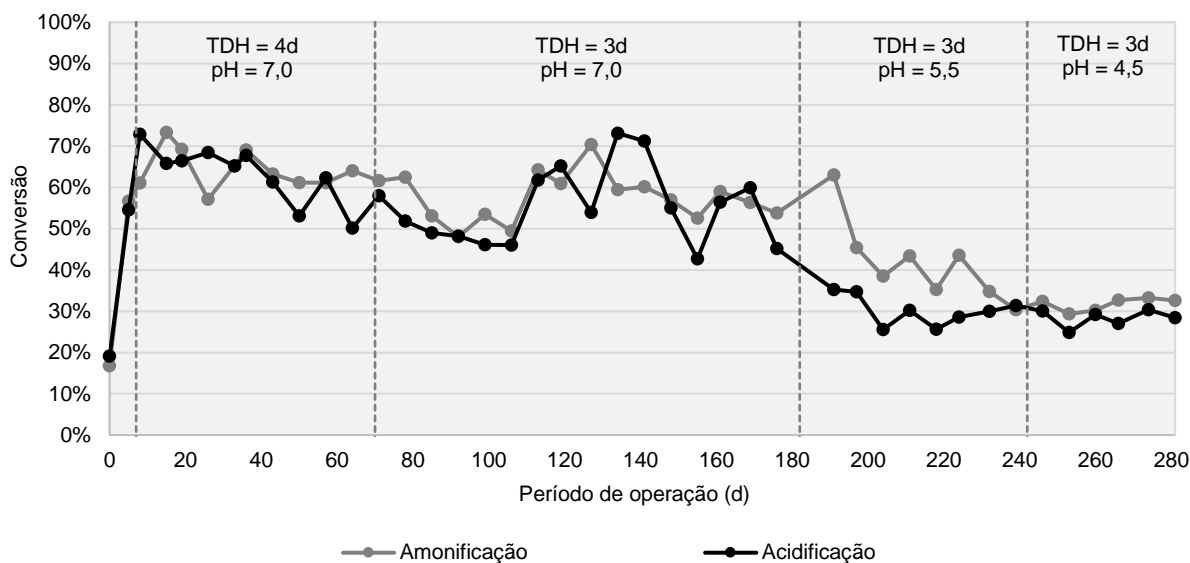
Diferente do que é relatado por alguns autores (BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES e VEIGA, 2017; OMIL; MÉNDEZ e LEMA, 1996; SOTO; MÉNDEZ e LEMA, 1991; VEIGA; MÉNDEZ e LEMA, 1994), o alto grau de amonificação obtido neste estudo, que gerou concentrações de amônio de até $2,4 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ no reator, não prejudicou a conversão do substrato e conseqüentemente a produção de AO devido à inibição. A amônia é produzida por meio da degradação biológica da matéria nitrogenada, que está presente principalmente na forma de proteínas e ureia (KAYHANIAN, 1999; OMIL; MÉNDEZ e LEMA, 1996). Veiga; Méndez e Lema (1994) observaram uma queda na concentração de ácido acético em um reator de filme fixo estacionário de fluxo descendente – *downflow stationary fixed film* (DSFF) -

tratando água de cozimento de atum e os autores acreditam que isso pode ser explicado por uma inibição temporária das arqueias metanogênicas acetoclásticas na presença de altas concentrações de amônia, oriundas da degradação de proteínas. Tal inibição também foi observada por Soto; Méndez e Lema (1991) em um estudo sobre biodegradabilidade e toxicidade no tratamento anaeróbio de águas residuárias de conservas de peixes. Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) afirmam que o alto teor de nitrogênio dos resíduos de atum pode ser um importante fator inibitório para a digestão anaeróbia.

Os resultados publicados na literatura sobre a inibição causada por substâncias tóxicas específicas como amônia, variam amplamente devido a diversos fatores, como o tipo de inóculo, composição de resíduos e condições operacionais (CADAVID-RODRÍGUEZ; VARGAS-MUÑOZ e PLÁCIDO, 2019; CAPSON-TOJO et al., 2020; JIANG et al., 2019; SHI et al., 2017; YENIGÜN e DEMIREL, 2013). Apesar da altas concentrações de amônia apresentarem um efeito inibitório na digestão anaeróbia, podem ser vantajosas quando o objetivo é a produção de AO, pois a atividade metanogênica reduzida normalmente resulta no acúmulo de compostos intermediários, como AO, uma vez que o declínio na atividade das bactérias fermentativas não ocorre na mesma extensão. Estudos relatam que o excesso de amônia causou inibição na metanogênese resultando em um acúmulo de AO (ANGELIDAKI; ELLEGAARD e AHRING, 1999; CADAVID-RODRÍGUEZ; VARGAS-MUÑOZ e PLÁCIDO, 2019; NIU et al., 2013; SHI et al., 2017). Os altos graus de acidificação observados neste estudo (valores acima de 55%) sempre concomitantes a maiores graus de amonificação (valores acima de 58%) indicam que o acúmulo de AO neste estudo também esteve relacionado a altas concentrações de amônia.

Na próxima etapa, na qual o pH foi baixado para 5,5, houve diminuição do grau de amonificação e acidificação, os quais apresentaram respectivos valores médios de 42 ± 10 e $30 \pm 4\%$ (Figura 22). Na etapa seguinte, quando o pH era de 4,5, a conversão do substrato foi ainda mais prejudicada, pois o reator apresentou grau de amonificação de $32 \pm 1,5\%$ e de acidificação de $28 \pm 2\%$. Esses resultados foram consistentes com os resultados apresentados por Bevilacqua et al. (2021), os autores obtiveram os maiores graus de acidificação em pH 7,0 (40–50%), independentemente da diferença no perfil de AA, enquanto os valores de pH 5,0 afetaram negativamente a conversão de proteínas em AGV (20 - 30%). Regueira et al. (2019) também afirma que a conversão de proteínas atinge seu máximo em valor de pH 7,0, variando de 85% a 94%.

Figura 22 – Grau de amonificação e acidificação no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva⁶.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: TDH – tempo de detenção hidráulica.

Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) também observaram uma queda na produção de AGV a partir da digestão em batelada de resíduos de atum em um pH de 5,0. No dia 39, a fermentação atingiu o estado estacionário e a concentração final de AGV total diminuiu de acordo com a seguinte tendência de pH: 8 > 9 > 7 > 10 > 6 > 5 > branco. A máxima produção de AGV de 30,611 mg DQO L⁻¹ foi atingida após 32 dias de digestão acidogênica em um pH 8,0 e apresentou concentrações três vezes maiores do que as obtidas para o pH mais baixo testado, ou seja, 5,0. Outros autores também observaram graus de acidificação mais baixos em condições ácidas ($\leq 5,5$) (BREURE e VAN ANDEL, 1984; YU e FANG, 2003).

No estudo conduzido por Yu e Fang (2003) a eficiência de degradação (60% a 97,5%) e grau de acidificação (32% a 72%) da gelatina aumentaram substancialmente ao elevar o pH de 4,0 para 6,5. Os autores afirmam que a acidogênese da gelatina foi mais sensível na faixa de pH mais baixa (4,0 a 5,0), o que pode ser devido às atividades enzimáticas limitadas para hidrólise e fermentação do substrato nessas condições. Tais limitações na hidrólise e fermentação do substrato também foram observadas neste estudo conforme o pH foi diminuído. Uma queda nos resultados de amonificação de valores em torno de 60% para valores em torno de 40% para pH 5,5 e 30% para pH 4,5 indicam isso. A diminuição do TDH de 4 para 3 dias, por outro lado, não causou um prejuízo significativo na conversão do substrato ou produção de

⁶A primeira linha pontilhada separa o período de adaptação do reator durante a inoculação do restante da operação

AO, uma vez que o grau de amonificação diminuiu de uma faixa de 65% para 60% e o grau de acidificação caiu de uma faixa de 60% para 55%.

11.3.4 Influência do TDH e pH no espectro de produtos

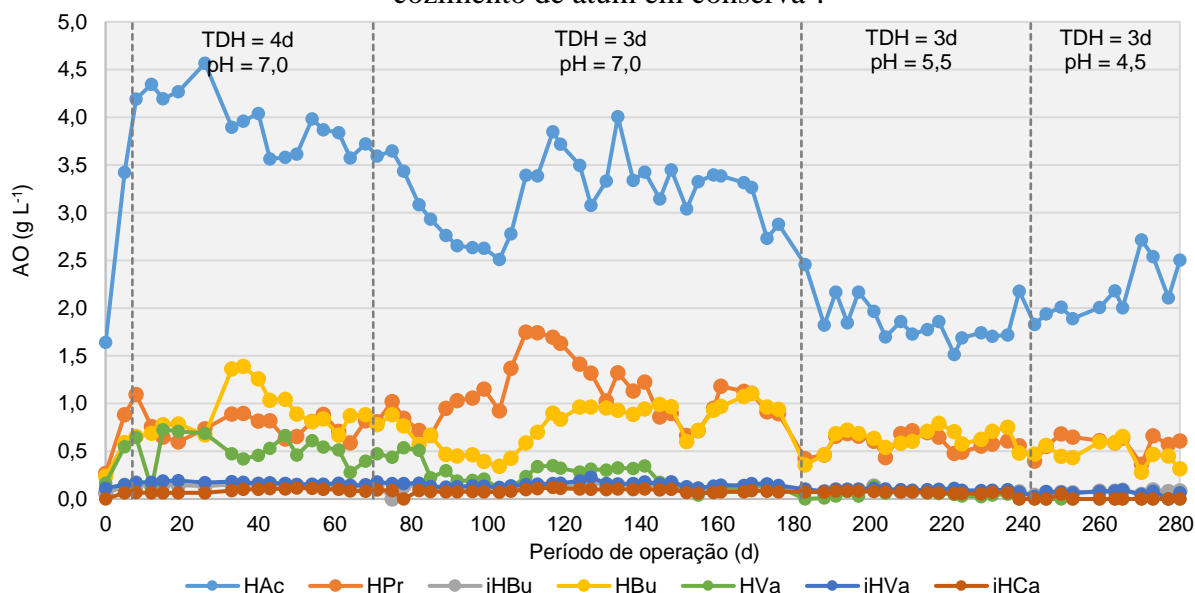
Em todas as etapas operacionais, o reator apresentou maior concentração (Figura 23) e fração (Figura 24) de ácido acético, com uma concentração que variou de $1,52 \text{ g L}^{-1}$ (TDH de 3 dias e pH 5,5) a $4,6 \text{ g L}^{-1}$ (TDH de 4 dias e pH 7,0) e fração média que variou de $55,4 \pm 5\%$ (TDH de 3 dias e pH 5,5) a $68,8 \pm 3,4\%$ (TDH de 4 dias e pH 7,0). Os ácidos propiônico e butírico apresentaram uma fração muito próxima entre si (valores médios entre 10-17%) dos ácidos obtidos em todas as etapas. Portanto, ambos podem ser considerados como o segundo produto principal para todas as condições avaliadas, com exceção da condição de TDH de 3 dias e pH 7,0, na qual a fração média de ácido propiônico foi de $17,6 \pm 3,9\%$ e a fração média de ácido butírico correspondeu a $10,6 \pm 2,5\%$ (Figura 24).

Os ácidos isobutírico, isovalérico, n-valérico e isocapróico foram produtos secundários responsáveis por menos de 10% da porcentagem molar total de AO. No estudo conduzido por Bevilacqua et al., (2020), que avaliaram a produção de AGV com caseína e gelatina também foi observada uma predominância pelo ácido acético, no entanto, os espectros do produto foram diferentes, com ácido n-butírico como o segundo produto principal para caseína e ácido propiônico para gelatina, além de mais produtos reduzidos em detrimento do ácido acético obtidos da caseína do que da gelatina. Os autores afirmam que grande proporção de glicina na gelatina, um precursor do ácido acético, é provavelmente responsável pelo predomínio desse ácido em todos os testes de gelatina. A glicina é reduzida a acetato (REGUEIRA et al., 2019) e este foi o principal AA presente na ARCAC avaliada neste estudo, correspondendo a uma fração média de $20,7 \pm 1\%$ (Figura 18). Isto pode explicar a alta fração de ácido acético (>55% para todas as condições avaliadas) observada também neste estudo, além de uma menor variação no espectro de AO (Figura 24).

Tal predominância de ácido acético obtida para este estudo também foi observada em outros estudos conduzidos com substratos similares. Os principais produtos da fermentação contínua da gelatina por cultura mista anaeróbia obtidos no estudo conduzido por Breure e Van Anel (1984) foram acetato, propionato e valerato, e pequenas quantidades de outros AGV. O ácido acético foi de longe o ácido majoritário em todos os valores de pH (5,0 a 10,0) estudados por Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) para a digestão anaeróbia de resíduo de atum,

com um valor máximo de 60% do total de AGV em pH 8,0. Veiga; Méndez e Lema (1994) também relatam o ácido acético como o principal AGV produzido em um reator DSFF tratando água de cozimento de atum. No estudo conduzido por Yu e Fang (2003) o acetato foi o principal AGV, em uma faixa de 20 a 27%, com um valor médio de 24% a partir de um efluente sintético à base de gelatina. Apesar de tais estudos não terem apresentado uma análise dos AA para a caracterização dos substratos utilizados, sua composição semelhante ao substrato utilizado neste estudo conhecidos por suas altas concentrações de glicina corrobora este AA como possível responsável pela alta produção de ácido acético obtida neste estudo.

Figura 23 – Concentração de AO no reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva⁷.



Fonte: Elaborada pela autora.

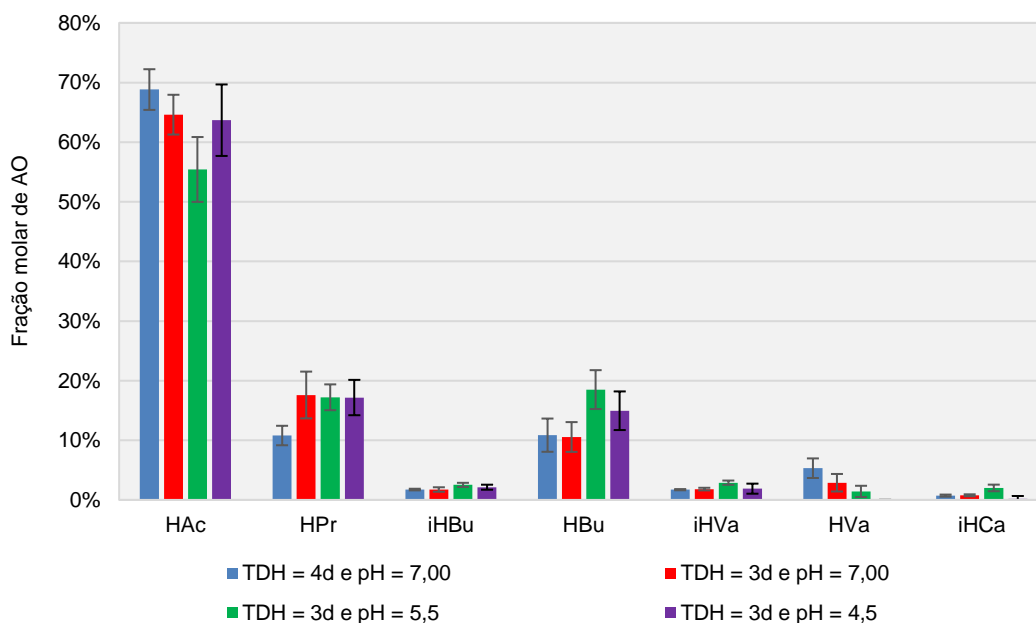
Siglas: TDH – tempo de detenção hidráulica; AO – ácidos orgânicos; HAc – ácido acético; HPr – ácido propiônico; iHBu – ácido isobutírico; HBu – ácido butírico; HVa – ácido valérico; iHVa – ácido isovalérico; iHCa – ácido isocaprílico.

Um aumento na fração média de ácido propiônico de $10,8 \pm 1,6\%$ para um TDH de 4 dias e pH 7,0 para uma fração média de $17,6 \pm 3,9\%$ para um TDH de 3 dias e pH 7,0 indica que o TDH foi o parâmetro que teve maior influência na produção deste ácido (Figura 24). Quando o TDH foi mantido em 3 dias e o pH foi alterado para 5,5 e 4,5, o ácido propiônico se manteve em uma fração em torno de 17%. Esta diminuição do TDH também influenciou na concentração do ácido propiônico que apresentou valores sempre abaixo de $0,9 \text{ g L}^{-1}$ para um

⁷A primeira linha pontilhada separa o período de adaptação do reator durante a inoculação do restante da operação

TDH de 4 dias, já para um TDH de 3 dias foi observada uma concentração média de $1,1 \text{ g L}^{-1}$ com valor máximo de até $1,74 \text{ g L}^{-1}$ mesmo com o mesmo valor de pH (7,0) (Figura 23). Ao diminuir o TDH de 4 para 3 dias houve um consequente aumento na COV de $3,75$ para $5 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, que pode ter sido na verdade o principal fator que influenciou em uma maior produção de ácido propiônico. Veiga; Méndez e Lema (1994) observaram que as concentrações de ácido propiônico aumentaram para uma COV de 3 para $4 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ no reator DSFF, indicando instabilidade. No entanto, é importante destacar que a instabilidade relatada pelos autores se relaciona à remoção de DQO e produção de metano, já que este era o objetivo do estudo. Neste estudo, conforme descrito no capítulo anterior, a diminuição do TDH e consequente aumento da COV não acarretou prejuízo para a produção de AO, como mostram os graus de acidificação obtidos (Figura 22).

Figura 24 – Comparação do espectro de AO entre todas as etapas do reator utilizado para processamento da água residuária de cozimento de atum em conserva.



Fonte: Elaborada pela autora.

Siglas: TDH – tempo de detenção hidráulica; AO – ácidos orgânicos; HAc – ácido acético; HPr – ácido propiônico; iHBu – ácido isobutírico; HBu – ácido butírico; HVa – ácido valérico; iHVa – ácido isovalérico; iHCa – ácido isocaprício.

Foi observado um consumo completo do ácido láctico durante toda a operação deste estudo. Enquanto a concentração de ácido láctico era de $2,1 \text{ g L}^{-1}$ no afluente, no efluente este nunca foi detectado, em nenhuma das condições avaliadas. Tang et al. (2017) estudaram o efeito do pH na produção de ácido láctico a partir da fermentação acidogênica de resíduos alimentares e relataram que o ácido láctico produzido foi convertido rapidamente em AGV em pH 6,0.

Bermúdez-Penabad; Kennes e Veiga (2017) relataram um forte aumento na concentração de outros AGV correspondente a uma rápida diminuição na concentração de ácido láctico. Os resultados de acidificação obtidos neste estudo (>25%) em conjunto com o consumo completo do ácido láctico indicam que houve a conversão completa deste substrato a outros AO.

Liang e Wan (2015) observaram que adição de ácido láctico teve um efeito positivo na produção de AGV, gerando um aumento de 152% na produção de ácido butírico a partir de bagaço de malte de cevada, no entanto, não resultou em aumentos significativos na produção de ácido valérico e ácido caprótico. O consumo de ácido láctico envolve o alongamento da cadeia de ácido láctico e ácido acético a n-butirato via β oxidação reversa. Os resultados obtidos neste estudo, indicam que o lactato foi alongado junto com o ácido acético a ácido n-butírico, já que ao analisar o espectro dos produtos (Figura 24), é possível afirmar que a fração média de HBU aumentou de $10,6 \pm 2,5\%$ para $18,5 \pm 3,3\%$ com uma diminuição do pH de 7,0 para 5,5, concomitante a uma diminuição na fração de ácido acético de $64,6 \pm 3,3\%$ para $55,4 \pm 5,4\%$. Na última etapa, quando o pH foi baixado para 4,5, a produção de HBU diminuiu de $18,5 \pm 3,3\%$ para $15,0 \pm 3,2\%$ e a produção de ácido acético subiu de $55,4 \pm 5,4\%$ para $63,7 \pm 6,0\%$ indicando que esta diminuição no pH foi prejudicial ao alongamento da cadeia de ácido láctico e ácido acético a n-butirato.

O ácido iso-caprótico apresentou baixas concentrações (0 a $0,12 \text{ g L}^{-1}$) e um aumento insignificante em suas frações médias ($0,8 \pm 0,2\%$ para $2,0 \pm 0,6\%$) quando o pH foi alterado de 7,0 para 5,5. O ácido n-caprótico não foi detectado em nenhuma condição de operação (Figura 23 e Figura 24). Tais resultados indicam que não foi possível obter um alongamento de cadeia a ácido caprótico a partir do ácido butírico em conjunto com o ácido láctico, mesmo ao utilizar a estratégia de diminuição do pH. Apesar do pH 5,5 ter proporcionado os melhores resultados de seletividade de HBU ($18,5 \pm 3,3\%$), tal seletividade foi baixa e a produção de ácido caprótico inexistente. Uma possível explicação para esse fenômeno é que os microbiomas do reator que atuam na produção de AO não foram capazes de converter quantidades extras de ácido butírico em AO de cadeia mais longa. Também deve-se levar em conta que a resultado da fermentação de substratos ricos em proteínas depende principalmente da composição da proteína e não apenas do pH. Bevilacqua et al., (2021) obtiveram um aumento mais pronunciado do ácido butírico em condições ácidas (pH 5,0) para reatores operados com caseína, enquanto o aumento para reatores operados com gelatina nas mesmas condições ácidas foi baixo, o que pode explicar os resultados obtidos neste estudo, já que a gelatina é um substrato cuja composição de AA se assemelha ao substrato utilizado neste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o pH afeta a estequiometria da conversão de proteínas em AO. O pH neutro (7,0) pode maximizar a degradação de proteínas, enquanto um espectro de produto mais diversificado é obtido em condições ácidas (pH 4,5 e 5,5). No entanto, essa diversidade no espectro do produto não foi tão alta, demonstrando que o resultado da fermentação de substratos ricos em proteínas depende em igual grau de importância ou talvez até mais da composição da proteína do que do pH. Independentemente do tipo de proteína utilizada como substrato ainda é extremamente difícil obter uma alta seletividade já que as proteínas e seus mecanismos de fermentação não foram estudados tão exaustivamente. Sua principal complexidade reside no fato de que a proteína pode ser considerada como uma mistura de cerca de 20 substratos diferentes, ou seja, os AA. Apesar das reações Stickland serem amplamente aceitas como o principal mecanismo de conversão de AA em AGV (RAMSAY; PULLAMMANAPPALLIL, 2001), já foi demonstrado que sua estequiometria fixa não reproduz completamente o resultado da fermentação de proteínas pois o consumo preferencial de AA depende de suas interações (BEVILACQUA et al., 2020).

11.4 Conclusões

Este estudo mostrou a viabilidade de obter produção contínua e relevante de ácidos orgânicos (AO) por fermentação de cultura mista a partir de um efluente real com alta concentração de proteínas e salinidade, a água residuária de cozimento de atum em conserva. Um grau de acidificação acima de 60% e de amonificação acima de 65% foi observado em pH 7,00 e TDH de 4 dias. Com relação à seletividade de produtos, foi possível aumentar a fração molar média de ácido butírico de aproximadamente 10% para 18% e de ácido isocapróico de 0,7% para 2%, ao reduzir o pH de 7,0 para 5,5. Esta baixa seletividade indica que diferentes estratégias/rotinas operacionais ainda precisam ser desenvolvidas a fim de direcionar a produção para um produto específico de interesse e otimizar a produção de AO. Mudanças em algumas condições operacionais, como o pH, modificam as vias de degradação preferidas de diferentes aminoácidos (AA), e conseqüentemente, afetam o espectro do produto previsto. No entanto, como a degradação de proteínas não possui estequiometria fixa, ou seja, alguns AA podem ter diferentes produtos de degradação dependendo das condições operacionais ou das interações com outros AA, ainda é difícil obter alta seletividade no processo para o AO desejado.

**Parte V - CONCLUSÕES GERAIS E PROPOSTAS DE ESTUDOS
FUTUROS**

12 CONCLUSÕES GERAIS

Baseando-se nos objetivos inicialmente propostos e nos resultados obtidos do presente trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- A produção de biohidrogênio (bioH_2) sem ajuste algum de pH mostrou-se viável apenas para meio contendo sacarose, um substrato simples. Acredita-se que melhores estratégias operacionais precisam ser desenvolvidas para águas residuárias reais que constituem substratos mais complexos. Portanto, a hipótese de que é possível obter produção contínua e estável de bioH_2 com soro de queijo e vinhaça de cana-de-açúcar sem ajuste de pH foi refutada.
- Ao comparar o desempenho de um reator UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo) com um reator de leito fixo estruturado (LE) na fermentação escura do soro de queijo, ambos apresentaram produção de ácidos orgânicos (AO) e solventes em altas concentrações, com valores bem próximos. Considerando a produção de H_2 , o reator UASB apresentou uma produção mais estável, além de um valor máximo de HY ($5,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$) mais alto do que o observado no reator LE ($3,0 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ sacarose}_{\text{consumida}}$). No entanto, como mencionado acima, tal produção foi observada apenas com sacarose e não com soro de queijo. Portanto a hipótese de que o reator UASB apresenta uma configuração mais vantajosa para a produção de hidrogênio sem ajuste de pH devido a sua capacidade de autorregulação do sistema foi parcialmente confirmada.
- Os resultados obtidos neste estudo e também no estudo conduzido por Mota et al. (2018) indicam que um pH abaixo de 3,0 é a condição ideal para que a produção de bioH_2 sem ajuste de pH ocorra pela rota concomitante do acetato e etanol, e tal condição só pôde ser mantida com o substrato composto de sacarose. Quando os reatores foram alimentados com soro de queijo ou vinhaça de cana-de-açúcar, o pH manteve-se em valores sempre acima de 3,0, em torno de 4,0-4,5 e outras rotas metabólicas e microrganismos que estão associadas a baixos valores de produção de H_2 foram predominantes.
- A estratégia de usar água residuária a base de sacarose durante a partida mostrou-se efetiva para a seleção de microrganismos produtores de hidrogênio adaptados a condições extremamente ácidas. Tal estratégia também foi efetiva para a

redução de *Lactobacillus* que têm sido apontados como inibidores de produção de H₂. Portanto, a hipótese de que é possível selecionar bactérias produtoras de hidrogênio adaptadas a condições extremamente ácidas por meio de um estresse seletivo para um metabolismo desejado em um sistema de comunidade microbiana foi confirmada. No entanto, como tais microrganismos produtores de H₂ não foram capazes de prevalecer conforme o substrato foi trocado gradativamente por um efluente real, melhores estratégias de operação que favoreçam tais microrganismos precisam ser avaliadas.

- Os três substratos avaliados neste estudo (soro de queijo, vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de cozimento de atum em conserva) mostraram um grande potencial para a produção de AO por fermentação escura. Vale destacar que resultados extremamente promissores foram obtidos mesmo nas etapas em que não foi utilizado ajuste algum de pH, apesar da suplementação com alcalinidade ainda ser relatada amplamente na literatura como essencial para a digestão anaeróbia. Portanto, a hipótese de que é possível obter produção contínua e estável de AO e solventes com substratos complexos constituídos de águas residuárias reais sem ajuste de pH foi confirmada. Também foi confirmada a hipótese de que as proteínas apresentam grande potencial para a produção de AO e é possível obter uma produção contínua e estável a partir de águas residuárias reais ricas deste substrato utilizando culturas mistas de microrganismos.
- Por meio de uma diminuição no pH, foi possível direcionar a produção de AO a ácido butírico a partir da fermentação da água residuária de cozimento de atum em conserva. No entanto, a composição do substrato se mostrou tão importante quanto o pH de operação, pois a estratégia de redução de pH resultou em uma baixa seletividade de produtos. A utilização de culturas mistas e substratos constituídos de águas residuárias reais dificulta a seletividade de produtos devido à sua complexidade, interação entre os aminoácidos (AA) e vários processos envolvidos na sua conversão. Portanto, a hipótese de que é possível obter maior seletividade de AO obtidos a partir da fermentação de substratos ricos em proteínas, por meio de estratégias operacionais adequadas, foi parcialmente confirmada.

13 PROPOSTAS DE ESTUDOS FUTUROS

Com base no conceito de economia circular, que preconiza a biorrecuperação de resíduos como um aspecto essencial propõem-se estratégias sustentáveis que viabilizem a produção de produtos biotecnológicos de maior valor agregado:

- Avaliação da fermentação escura sem ajuste de pH de outros substratos reais e ricos em açúcares, como o melaço de cana-de-açúcar, por exemplo visando a produção de bioH₂, ácidos orgânicos (AO) e solventes;
- Avaliação da utilização do melaço de cana-de-açúcar ao invés da sacarose como substrato utilizado no *start-up* dos reatores para adaptação da biomassa com a finalidade de produzir bioH₂ e AO em condição de pH abaixo de 3,0;
- Investigação das vias metabólicas e do microbioma associado em reator acidogênico contínuo tratando o soro de queijo por meio de metatranscriptômica;
- Avaliação da fermentação escura sem ajuste de pH da vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* com foco na produção de AO, já que neste estudo foram obtidos resultados extremamente promissores destes produtos, porém foi utilizada apenas vinhaça diluída;
- Adição de lactato para cofermentação com efluente de água de cozimento de atum em conserva para a obtenção de maior seletividade no espectro de produtos, direcionando a produção a ácido butírico e alongamento de cadeia a ácido capróico;
- Avaliação econômica de diferentes cenários envolvendo a produção de AO. Uma vez que a rentabilidade econômica pode ocorrer para determinado AO mas não para outro, tal avaliação poderia direcionar as pesquisas experimentais para determinado tipo de ácido.

De uma forma geral, mais estudos deveriam ser desenvolvidos focando na produção de AO por si só, já que são produtos de grande valor agregado e não apenas como precursores do biogás ou biopolímeros. Também seria de extremo interesse que a utilização de ajuste de pH, que é amplamente relatado na literatura atual como essencial para a fermentação escura, fosse diminuída ou até mesmo eliminada, já que isto acarreta em grande custo para o processo, seja devido à compra de agentes químicos ou energia consumida na recirculação de efluentes.

REFERÊNCIAS

ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 406–414, 2014.

ALBANEZ, R. et al. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 20473–20484, dez. 2016.

ALBANEZ, R. et al. Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27–41, jan. 2018.

ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B. K. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 3, p. 363–372, maio 1999.

ANGENENT, L. T. et al. Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology To Produce Biochemicals. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 6, p. 2796–2810, 15 mar. 2016.

ANTONOPOULOU, G. et al. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 15, p. 5227–5233, 2008.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P. et al. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 46–54, mar. 2015.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1551–1561, maio 2016.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; ZAIAT, M.; WEVER, H. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 42–49, fev. 2016.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. [s.l: s.n.].

AQUINO, S. F. DE; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152–161, 2005.

ARASARATNAM, V.; SENTHURAN, A.; BALASUBRAMANIAM, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 7, p. 482–486, nov. 1996.

ARIMI, M. M. et al. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 101–118, abr. 2015.

AROOJ, M. F. et al. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 13, p. 3289–3294, jul. 2008.

ASUNIS, F. et al. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 1–9, out. 2019.

ATASOY, M. et al. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 773–786, nov. 2018.

BAGHCHEHSARAEI, B. et al. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 6, p. 2573–2579, mar. 2009.

BANU, R. J. et al. Industrial wastewater to biohydrogen: Possibilities towards successful biorefinery route. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 1–18, fev. 2020.

BANU, R. J. et al. A critical review on limitations and enhancement strategies associated with biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 31, p. 16565–16590, maio 2021.

BERMÚDEZ-PENABAD, N.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. **Waste Management**, v. 68, p. 96–102, out. 2017.

BEVILACQUA, R. et al. Protein composition determines the preferential consumption of amino acids during anaerobic mixed-culture fermentation. **Water Research**, v. 183, p. 115958, 2020.

BEVILACQUA, R. et al. Steering the conversion of protein residues to volatile fatty acids by adjusting pH. **Bioresource Technology**, v. 320, p. 124315, jan. 2021.

BHATIA, S. K.; YANG, Y. H. Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 327–345, 2017.

BILBAO, J. L. G. Aprovechamiento de suero de leche desproteínizado y de materiales nitrogenados de desecho por algunas levaduras. **Alimentaria**, v. 18, n. 119, p. 65–69, 1981.

BLANCO, V. M. C. **Produção de hidrogênio e metano a partir de soro de leite em reatores anaeróbios de leito estruturado**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.

BLANCO, V. M. C.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 17, p. 12181–12196, abr. 2017.

BOHAK, I. et al. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 360–364, ago. 1998.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 848–857, ago. 2019.

BONK, F. et al. Exploring the selective lactic acid production from food waste in uncontrolled pH mixed culture fermentations using different reactor configurations. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 416–424, 2017.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2007. v. 2

BREURE, A. M.; MOOIJMAN, K. A.; VAN ANDEL, J. G. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 426–431, 1 ago. 1986.

BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G. Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein, gelatin, in an anaerobic continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 40–45, 1 jul. 1984.

BUITRÓN, G. et al. Biohydrogen production from winery effluents: control of the homoacetogenesis through the headspace gas recirculation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 544–552, 1 mar. 2020.

CABROL, L. et al. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 043, p. 158–181, 2017.

CADAVID-RODRÍGUEZ, L. S.; VARGAS-MUÑOZ, M. A.; PLÁCIDO, J. Biomethane from fish waste as a source of renewable energy for artisanal fishing communities. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 34, p. 110–115, ago. 2019.

CALLAHAN, B. J. et al. Dada2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–586, 2016.

CAPSON-TOJO, G. et al. Unraveling the literature chaos around free ammonia inhibition in anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109487, 1 jan. 2020.

CARRILLO-REYES, J. et al. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5591–5601, abr. 2012.

CARRILLO-REYES, J. et al. Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 22, p. 11423–11432, 24 jul. 2014.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013.

CASSMAN, N. A. et al. Genome-resolved metagenomics of sugarcane vinasse bacteria. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 48, 2018.

CASTELLÓ, E. et al. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 14, p. 5674–5682, jul. 2009.

CASTELLÓ, E. et al. Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 11, p. 2265–2273, dez. 2011.

CASTELLÓ, E. et al. Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 5, p. 2654–2665, fev. 2018.

CASTELLÓ, E. et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109602, mar. 2020.

CASTILLA-ARCHILLA, J.; PAPIRIO, S.; LENS, P. N. L. Two step process for volatile fatty acid production from brewery spent grain: Hydrolysis and direct acidogenic

fermentation using anaerobic granular sludge. **Process Biochemistry**, v. 100, p. 272–283, jan. 2021.

CHATZIPASCHALI, A. A. et al. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. **Energies**, v. 5, n. 9, p. 3492–3525, set. 2012.

CHEN, W.-M. et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 10, p. 1063–1070, ago. 2005.

CHERNICHARO, C. A. DE L. **Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Reatores Anaeróbios**. 2. ed. [s.l.] Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA/UFGM, 2007.

CHOJNACKA, A. et al. Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10057–10064, nov. 2011.

COHEN, S. A.; DEANTONIS, K.; MICHAUD, D. P. Compositional Protein Analysis Using 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, a Novel Derivatization Reagent. **Techniques in Protein Chemistry IV**, p. 298–298, 1993.

COLIN, V. L. et al. Potential application of a bioemulsifier-producing actinobacterium for treatment of vinasse. **Chemosphere**, v. 144, p. 842–847, fev. 2016.

COLOMBO, B. et al. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) as products of a two-steps bioprocess from deproteinized dairy wastes. **Waste Management**, v. 95, p. 22–31, jul. 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Norma Técnica P 4.231. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. . 2015, p. 1–15.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar: safra 2019/2020. **Observatório Agrícola**, v. 6, n. 4, p. 58, 2020.

COUTO, P. T. et al. Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217–6230, fev. 2020.

CRISTÓVÃO, R. O. et al. Assessing the influence of oil and grease and salt content on fish canning wastewater biodegradation through respirometric tests. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 343–351, jul. 2016.

CRUZ, R. L.; RIGHETTO, A. M.; NOGUEIRA, M. A. Experimental Investigation of Soil and Ground Water Impacts Caused by Vinasse Disposal. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 11, 1991.

DAS, D.; VEZIROĞLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, n. 1, p. 13–28, jan. 2001.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 10, p. 4296–4304, maio 2009.

DIAZ, M. J. et al. Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1143–1150, maio 2002.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35°C. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 8, 2010.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELBESHISHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656–668, nov. 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Surtos da mosca-dos-estábulo próximos a usinas de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2649716/artigo-surtos-da-mosca-dos-estabulos-proximos-a-usinas-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 25 nov. 2021.

ENG SÁNCHEZ, F. et al. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, fev. 2021.

EUROPEAN COMMISSION. **Circular economy action plan**. Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/strategy/circular-economy-action-plan_en>. Acesso em: 26 nov. 2021.

FENG, X.-H. et al. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 9, p. 1077–1085, 1 nov. 2010.

FERNANDES, B. S. et al. The Effect of Biomass Immobilization Support Material and Bed Porosity on Hydrogen Production in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1348–1366, 2013.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16852–16862, out. 2014.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 81–88, jun. 2015a.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94–105, ago. 2015b.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94–105, ago. 2015c.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The canned seafood sector in Spain**. Disponível em: <<https://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resource-detail/en/c/338172/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

FORESTI, E. **Fundamentos do processo de digestão anaeróbia**. III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento anaeróbico de águas residuais. **Anais...Montevideo, Uruguay: 1994**.

FRA-VÁZQUEZ, A. et al. Volatile fatty acid production from saline cooked mussel processing wastewater at low pH. **Science of the Total Environment**, v. 732, p. 139337, 2020.

FUESS, L. T. et al. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8132–8145, maio 2016.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017a.

FUESS, L. T. et al. Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs? **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209–220, mar. 2017b.

FUESS, L. T. et al. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 426–433, 2018.

FUESS, L. T. et al. Biochemical butyrate production via dark fermentation as an energetically efficient alternative management approach for vinasse in sugarcane biorefineries. **Renewable Energy**, v. 158, p. 3–12, 1 out. 2020.

FUESS, L. T. et al. Full details on continuous biohydrogen production from sugarcane molasses are unraveled: Performance optimization, self-regulation, metabolic correlations and quanti-qualitative biomass characterization. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, p. 128934, 15 jun. 2021.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, dez. 2014.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29–40, set. 2018.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, ago. 2019.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Molasses vs. juice: Maximizing biohydrogen production in sugarcane biorefineries to diversify renewable energy generation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, p. 101534, 1 out. 2020.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Thermophilic biodigestion of fermented sugarcane molasses in high-rate structured-bed reactors: Alkalization strategies define the operating limits. **Energy Conversion and Management**, v. 239, p. 114203, 1 jul. 2021.

GAVALA, H. N. et al. Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 73, n. 1, p. 59–63, maio 1999.

GIOANNIS, G. DE et al. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930–20941, dez. 2014.

GOMES, B. C. et al. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 28, p. 8650–8660, jul. 2015.

GOMEZ-ROMERO, J. et al. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 24, p. 12541–12550, ago. 2014.

GRATTEPANCHE, F.; LACROIX, C. 13 - Production of viable probiotic cells. Em: MCNEIL, B. et al. (Eds.). **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2013. p. 321–352.

GREENHILL, S. J. **Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel**. Chicago, IL, 2004. Disponível em: <<http://koal2.cop.fi/leonardo/fbg>>

GUTIÉRREZ, J. L. R.; ENCINA, P. A. G.; FDZ-POLANCO, F. Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 37, n. 3, p. 271–276, jan. 1991.

GYALAI-KORPOS, M. et al. EVALUATION OF AN ONLINE FERMENTATION MONITORING SYSTEM. **Acta Alimentaria**, v. 43, n. 1, p. 76–87, 2014.

HAFEZ, H. et al. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 81–92, 2009a.

HAFEZ, H. et al. Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 18, p. 7603–7611, set. 2009b.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 287–297, maio 2009.

HAN, M. V.; ZMASEK, C. M. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. **BMC Bioinformatics**, p. 1–6, 2009.

HAWKES, F. R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 525–533, fev. 1995.

HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 19 set. 2016.

HWANG, M. H. et al. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. **Journal of Biotechnology**, v. 111, n. 3, p. 297–309, ago. 2004.

IGLESIAS-IGLESIAS, R. et al. Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121817, nov. 2019.

IGLESIAS-IGLESIAS, R. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce volatile fatty acids: combined effect of substrate/inoculum ratio and initial alkalinity. **Environmental Technology**, p. 1–11, mar. 2020.

IGLESIAS-IGLESIAS, R.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Valorization of sewage sludge in co-digestion with cheese whey to produce volatile fatty acids. **Waste Management**, v. 118, p. 541–551, dez. 2020.

JEISON, D. **Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: feasibility and potential applications**. Wageningen, The Netherlands: Research School for The Socio-Economic and Natural Sciences of the Environment, Wageningen University, 2007.

JEISON, D. et al. Effects of the acidogenic biomass on the performance of an anaerobic membrane bioreactor for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1951–1956, 2008.

JEISON, D.; LIER, J. B. VAN. Thermophilic treatment of acidified and partially acidified wastewater using an anaerobic submerged MBR: Factors affecting long-term operational flux. **Water Research**, v. 41, n. 17, p. 3868–3879, set. 2007.

JIANG, Y. et al. Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 100899, 1 dez. 2019.

KAYHANIAN, M. Ammonia Inhibition in High-Solids Biogasification: An Overview and Practical Solutions. **Environmental Technology**, v. 20, n. 4, p. 355–365, 1 abr. 1999.

KE, S. et al. **Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment** *Int. J. Environment and Pollution*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.environmental-expert.com/Files/6471/articles/6262/f101119712463852.pdf>>.

KHANAL, S. K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

KIM, I. S. et al. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1133–1140, set. 2004.

KIM, S. I. et al. Shift in bacterial diversity in acidogenesis of gelatin and gluten seeded with various anaerobic digester inocula. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123158, 1 jun. 2020.

KIM, T.-H. et al. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 136–141, jan. 2012.

KISAALITA, W. S.; LO, K. V.; PINDER, K. L. Influence of whey protein on continuous acidogenic degradation of lactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 6, p. 642–646, set. 1990.

KLEEREBEZEM, R. et al. Anaerobic digestion without biogas? **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 4, p. 787–801, dez. 2015.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey Utilization and Whey Products. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 7, p. 1149–1160, jul. 1979.

KOSIKOWSKI, F. V.; WIERZBICKI, L. E. Lactose Hydrolysis of Raw and Pasteurized Milks by *Saccharomyces lactis* lactase. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 1, p. 146–148, jan. 1973.

KOUTROULI, E. C. et al. Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3718–3723, ago. 2009.

KUHNER, C. H. et al. *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov. : acid-tolerant, N₂-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 873–881, 2000.

KURAKU, S. et al. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server, p. W23–W28, 2013.

LAGOA-COSTA, B.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 308, p. 1–12, jul. 2020.

LAY, J. J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and bioengineering**, v. 68, n. 3, p. 269–78, maio 2000.

LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, abr. 2014.

LEE, Y. J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 694–698, jun. 2002.

LEITÃO, R. C. et al. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 9, p. 1105–1118, 1 jun. 2006.

LEITE, J. A. C. et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 579–586, 2008.

LETTINGA, G. et al. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 4, p. 699–734, abr. 1980.

LETTINGA, G.; POL, L. W. H.; ZEEMAN, G. Biological wastewater treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment. **Lecture Notes. Wageningen Agricultural University**, ed, 1996.

LI, Z. et al. The complete genome sequence of *Ethanoligenens harbinense* reveals the metabolic pathway of acetate-ethanol fermentation: A novel understanding of the principles of anaerobic biotechnology. **Environment International**, v. 131, p. 1–13, out. 2019.

LIANG, S.; WAN, C. Carboxylic acid production from brewer's spent grain via mixed culture fermentation. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 179–183, 1 abr. 2015.

LIMA, D. M. F. et al. BIOHYDROGEN FROM CHEESE WHEY TREATMENT IN AN AnSBBR: ACHIEVING PROCESS STABILITY. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 397–408, abr. 2015.

LIU, G.; SHEN, J. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 251–256, jan. 2004.

LOPES, H. J. S.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Co-Fermentation of Cheese Whey and Crude Glycerol in EGSB Reactor as a Strategy to Enhance Continuous Hydrogen and Propionic

Acid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 712–728, nov. 2017.

LOVATO, G. et al. ScienceDirect Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin : Interaction effects of organic load , cycle time and feed strategy. v. 2, p. 1–10, 2017.

LOVATO, G. et al. Reactor start-up strategy as key for high and stable hydrogen production from cheese whey thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, p. 27364–27379, 2021.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUO, G. et al. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8700–8706, set. 2011.

LUONGO, V. et al. Repeated-Batch Fermentation of Cheese Whey for Semi-Continuous Lactic Acid Production Using Mixed Cultures at Uncontrolled pH. **Sustainability**, v. 11, n. 12, p. 1–12, jun. 2019.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. DA. Toposseqüência de solos fertigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 525–532, dez. 2003.

MADRID, L.; DÍAZ-BARRIENTOS, E. Release of metals from homogeneous soil columns by wastewater from an agricultural industry. **Environmental Pollution**, v. 101, n. 1, p. 43–48, jan. 1998.

MAGRINI, F. E. et al. Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198–12204, 2012.

MARCHETTI, R.; VASMARA, C. Co-digestion of Deproteinized Dairy Waste With Pig Slurry: Effect of Recipe and Initial pH on Biogas and Volatile Fatty Acid Production. **Bioenergy Research**, p. 1–16, nov. 2019.

MARQUES, T. D. et al. Influence of hydraulic retention time on hydrogen production by treating cheese whey wastewater in anaerobic fluidized bed bioreactor - An approach for

developing countries. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1109–1117, 2019.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 236–241, mar. 2007.

MCCARTY, P. L. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. **Public Works**, v. 95, p. 91–94, 1964.

MCCARTY, P. L.; SMITH, D. P. Anaerobic wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 12, p. 1200–1206, 1986.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. Fourth ed. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2003.

MICOLUCCI, F. et al. Pilot-scale multi-purposes approach for volatile fatty acid production, hydrogen and methane from an automatic controlled anaerobic process. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 124297, set. 2020.

MIZUNO, O. et al. Effect of pH on Hydrogen Production from Noodle Manufacturing Wastewater. **ENVIRONMENTAL ENGINEERING RESEARCH**, v. 37, p. 97–106, nov. 2000.

MOCKAITIS, G. et al. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): Effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v. 79, n. 2, p. 198–206, 2006.

MONTECCHIO, D.; YUAN, Y.; MALPEI, F. Hydrogen production dynamic during cheese whey Dark Fermentation: New insights from modelization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 37, p. 17588–17601, set. 2018.

MORAES, B. DE S. et al. Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 594–601, 1 maio 2019.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil_ Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 44, p. 888–903, 2015.

MOSCOVIZ, R. et al. The environmental biorefinery: State-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. **Green Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 3159–3179, jul. 2018.

MOTA, V. T. et al. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? **Water Research**, v. 128, p. 350–361, 2018.

MOTA, V. T. et al. Metatranscriptomic analysis of an acidogenic reactor reveals sugarcane vinasse-compounds degradation pathways and associated microbiome. [s.d.].

MOTA, V. T. F. V. **Produção de hidrogênio em condições extremamente ácidas e avaliação do desempenho e recuperação de energia em sistemas de tratamento de dois estágios (acidogênico-metanogênico)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.

NERY, V. D. et al. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411–417, dez. 2018.

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 597–611, jan. 2017.

NIU, Q. et al. Mesophilic methane fermentation of chicken manure at a wide range of ammonia concentration: Stability, inhibition and recovery. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 358–367, 1 jun. 2013.

NIZ, M. Y. K. et al. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876–22887, ago. 2019.

OLIVEIRA, C. A. et al. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 4182–4192, 7 fev. 2020.

OLIVEIRA, B. G. DE et al. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200–201, p. 77–84, jun. 2013.

OLIVEIRA, G. DE H. D. et al. Effects of the Organic Loading Rate on Polyhydroxyalkanoate Production from Sugarcane Stillage by Mixed Microbial Cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1039–1055, dez. 2019.

OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic treatment of seafood processing waste waters in an industrial anaerobic pilot plant. **Water SA**, v. 22, n. 1, p. 173–181, 1996.

ORTEGÓN, G. P. et al. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of The Total Environment**, v. 539, p. 410–419, jan. 2016.

PANESAR, P. S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1–14, jan. 2007.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, set. 2007.

PATEL, A. et al. Valorization of volatile fatty acids derived from low-cost organic waste for lipogenesis in oleaginous microorganisms-A review. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124457, fev. 2021.

PEDREGOSA, F. et al. **Scikit-learn: Machine Learning in Python** *Journal of Machine Learning Research*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.jmlr.org/papers/volume12/pedregosa11a/pedregosa11a.pdf?source=post_page----->>.

PEIXOTO, G. et al. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953–8966, jul. 2011.

PEIXOTO, G. et al. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.

PENTEADO, E. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios**. [s.l.] University of São Paulo, 2012.

PENTEADO, E. D. et al. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, maio 2013.

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54–62, 2013.

PLESSAS, S. et al. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5951–5955, set. 2008.

POHLAND, F. G.; GHOSH, S. Developments in Anaerobic Stabilization of Organic Wastes - The Two-Phase Concept. **Environmental Letters**, v. 1, n. 4, p. 255–266, jan. 1971.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, nov. 2012.

PRIEST, F. G. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. **American Cancer Society**, p. 1–40, 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database, p. D590–D596, 2013.

RAMOS, L. R. et al. Controlling methane and hydrogen production from cheese whey in an EGSB reactor by changing the HRT. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1–12, 2019.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Improving EGSB reactor performance for simultaneous bioenergy and organic acid production from cheese whey via continuous biological H₂ production. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 7, p. 983–991, jul. 2017.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 29, p. 13081–13089, jul. 2018.

RAMSAY, I. R.; PULLAMMANAPPALLIL, P. C. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. **Biodegradation**, v. 12, n. 4, p. 247–256, 1 jul. 2001.

RECH, R. Estudo da produção de β -galactosidase por leveduras a partir do soro de queijo. **Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**, p. 87, 2003.

REGUEIRA, A. et al. Metabolic modeling for predicting VFA production from protein-rich substrates by mixed-culture fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 1–12, 2019.

REIS, C. M. DOS et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498–8509, jul. 2015.

RIBEIRO, B. T. et al. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 441–447, ago. 2010.

RIBEIRO, J. C. et al. Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of sugarcane vinasse without buffers in mesophilic and thermophilic conditions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, p. 1–12, 2021.

RIBEIRO, J. C. et al. Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of cheese whey without buffers under mesophilic condition. **Journal of Environmental Management**, v. 304, p. 1–15, 15 fev. 2022.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology : principles and applications**. [s.l: s.n.].

ROSA, P. R. F. et al. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 10–19, 1 jun. 2014.

RUGGERI, B.; TOMMASI, T.; SANFILIPPO, S. **BioH₂ & BioCH₄ through anaerobic digestion : from research to full-scale applications**. [s.l.: s.n.].

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, out. 2013.

SADDOUD, A.; HASSAÏRI, I.; SAYADI, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2102–2108, ago. 2007.

SÁNCHEZ, T. P. **Valorisation of saline wastewaters: a challenge for the obtainment of bioproducts**. [s.l.] Santiago de Compostela University, 2017.

SANTANA, R. S. DE S. et al. Effect of biomass configuration on the behavior of pilot-scale anaerobic batch reactors treating dairy wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 106, p. 80–87, 2016.

SAYED, S. et al. Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater. **Biological Wastes**, v. 23, n. 2, p. 117–142, jan. 1988.

SEAFOOD BRASIL. **Cadeia do atum no Brasil: do déficit comercial histórico ao superávit**. Disponível em: <<https://peixeetudodebom.com.br/noticia/cadeia-do-atum-no-brasil-do-deficit-comercial-historico-ao-superavit>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SEIXAS, F. L.; GIMENES, M. L.; FERNANDES-MACHADO, N. R. C. TRATAMENTO DA VINHAÇA POR ADSORÇÃO EM CARVÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Quim. Nova**, v. 39, n. 2, p. 172–179, 2016.

SHAH, H. N.; COLLINS, D. M. Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 2, p. 205–208, abr. 1990.

SHI, X. et al. Effects of free ammonia on volatile fatty acid accumulation and process performance in the anaerobic digestion of two typical bio-wastes. **Journal of Environmental Sciences**, v. 55, p. 49–57, 1 maio 2017.

SIKORA, A. et al. **Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?** [s.l.] IntechOpen, 2013.

SILVA, A. F. R. et al. Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113137, 1 out. 2021.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1–11, jul. 1996.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 6, p. 3820–3836, fev. 2016.

SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Biodegradability and toxicity in the anaerobic treatment of fish canning wastewaters. **Environmental Technology**, v. 12, n. 8, p. 669–677, 1 ago. 1991.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 416A-427A, 1983.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. 1996.

STAMS, A. J. M. et al. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 2, p. 352–362, 2012.

SYDNEY, E. B. et al. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 380–386, 1 maio 2014.

SYDNEY, E. B. et al. Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 1–7, abr. 2018.

TANG, J. et al. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 544–552, jan. 2017.

TANGO, M. S. A.; GHALY, A. E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, n. 1, p. 61–78, jan. 1999.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, jan. 1996.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF. **Dairy and Products Annual**. Brasília, Brasil: [s.n.]. Disponível em: <https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/05/Dairy-and-Products-Annual_Brasilia_Brazil_10-15-2020.pdf>.

VASALA, A.; PANULA, J.; NEUBAUER, P. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 117, n. 4, p. 421–431, jun. 2005.

VEIGA, M. C.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Anaerobic filter and DSFF reactors in anaerobic treatment of tuna processing wastewater. **Water Science and Technology**, v. 12, p. 425–432, 1994.

VENETSANEAS, N. et al. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3713–3717, ago. 2009.

VILELA, R. S. et al. Biofuel production from sugarcane molasses in thermophilic anaerobic structured-bed reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, p. 110974, 1 jul. 2021.

WU, X.; ZHU, J.; MILLER, C. Kinetics study of fermentative hydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose under controlled pH. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 6, p. 477–485, jun. 2013.

YANG, K.; YU, Y.; HWANG, S. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. **Water Research**, v. 37, n. 10, p. 2467–2477, maio 2003.

YENIGÜN, O.; DEMIREL, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 901–911, 1 maio 2013.

YU, H. Q.; FANG, H. H. P. Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. **Water Research**, v. 37, n. 1, p. 55–66, 1 jan. 2003.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Complex effluent streams as a potential source of volatile fatty acids. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, n. 3, p. 557–581, set. 2013.

ZHANG, Q. et al. Effect of different vegetable wastes on performance of volatile fatty acids production by anaerobic fermentation. **Science of The Total Environment**, v. 748, p. 142390, set. 2020.

ZHAO, X. et al. Characterization and overexpression of a [FeFe]-hydrogenase gene of a novel hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 18, p. 9598–9602, set. 2010.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of

Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2020.

ZHU, X. et al. The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14360, 25 set. 2015.

ZHU, Y.; YANG, S.-T. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 2, p. 143–157, 27 maio 2004.